

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO**

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

**ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE PROPAGACIÓN *IN VITRO* A
PARTIR DE DOS EXPLANTES DE *Solanum betaceum***

AUTORA:

KATHERINE SOFÍA SALAZAR VEGA

DIRECTORA:

IVONNE DE LOS ANGELES VACA SUQUILLO

Quito, agosto del 2020

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo Katherine Sofía Salazar Vega, con documento de identificación N° 1724184658, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy/somos autor/es del trabajo de grado/titulación intitulado: “ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE PROPAGACIÓN *IN VITRO* A PARTIR DE DOS EXPLANTES DE *Solanum betaceum*”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

A handwritten signature in blue ink that reads "Katherine Salazar." The signature is written over a horizontal dotted line.

Nombre: Katherine Sofía Salazar Vega

Cédula de identidad: 1724184658

Fecha: 14 de agosto de 2020

DECLARATORIA DE COAUTORÍA DEL DOCENTE TUTOR/A

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación ESTABLECIMIENTO DE UN PROTOCOLO DE PROPAGACIÓN *IN VITRO* A PARTIR DE DOS EXPLANTES DE *Solanum betaceum* realizado por Katherine Sofía Salazar Vega, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, agosto de 2020



Ivonne de los Ángeles Vaca Suquillo

Cédula de identidad: 1714726906

Dedicatoria

A mis padres, Magus y Jorge por brindarme su apoyo y amor infinito, por enseñarme a amar cada partícula de vida, lo cual fue mi motivación para estudiarla, por mantener mis pies en la tierra, a pesar de cada logro conseguido, por enseñarme que el esfuerzo siempre tiene su recompensa, por ser mi fortaleza y el mejor ejemplo a seguir.

A mis sobrinos Ale, Clau, Mati y Sebas, por cada risa, por su amor puro, por ser la luz en mi vida y mi razón para ser siempre mejor.

A toda mi familia, por cuidarme, amarme y demostrármelo a diario, por motivarme a crecer como persona y profesionalmente.

Agradecimiento

A mi tutora MSc. Ivonne Vaca Suquillo, por su calidez y calidad de persona, por la confianza brindada al abrirme las puertas al increíble mundo de la investigación científica, por la orientación, el apoyo y el tiempo dedicado a ayudar con los desafíos inherentes al desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, Jael Álvarez, Marco Pozo y Sebastián Pillalaza, por todo el apoyo gigante brindado a este proyecto, desde las risas hasta las horas que pasaron volando en la cámara de flujo.

Contenido

Introducción.....	1
Capítulo 1	3
1 Marco conceptual	3
1.1 <i>Solanum betaceum</i>	3
1.1.1 Localización mundial y nacional.....	3
1.1.2 Descripción.....	3
1.1.3 Importancia del cultivo.....	4
1.1.4. Problemas fitosanitarios	5
1.1.5. Propagación.....	6
1.2. Cultivo <i>in vitro</i>	7
1.2.1. Antecedentes del cultivo <i>in vitro</i> de <i>Solanum betaceum</i>	7
1.2.2. Medio de cultivo.....	8
1.2.3. Fases del cultivo <i>in vitro</i>	12
Capítulo 2	16
2 Metodología.....	16
2.1 Localización	16
2.2 Elección del explante y Protocolo de desinfección	16
2.2.1 Protocolo de desinfección de semillas.....	17
2.2.2 Protocolo de desinfección de yemas	18
2.3 Protocolo Pregerminativo.....	19
2.3.1 Tratamientos	19

2.3.2 Unidad experimental	19
2.3.3 Análisis estadístico	20
2.3.4 Variables y métodos de evaluación	20
2.4 Fase de Introducción	22
2.4.1 Tratamientos	22
2.4.2 Unidad experimental	23
2.4.3 Análisis estadístico	23
2.4.4 Variables y métodos de evaluación	24
2.5 Fase de Multiplicación	25
2.5.1 Factores de estudio	25
2.5.2 Tratamientos	25
2.5.3 Unidad experimental	26
2.5.4 Análisis estadístico	26
2.5.5 Variables y métodos de evaluación	27
Capítulo 3	29
3 Resultados y discusión	29
3.1 Tratamientos pregerminativos	29
3.1.1. Germinación	30
3.1.2 Número y color de hojas	33
3.1.3 Contaminación bacteriana	35
3.2 Fase de introducción.....	35
3.2.1 Respuesta morfogénica.....	36

3.2.2 Contaminación bacteriana	40
3.3 Fase de multiplicación.....	41
3.3.1 Porcentaje de brotación	42
3.3.2 Número y Color de hojas.....	43
3.3.3 Índice de multiplicación (IM).....	46
Conclusiones	48
Recomendaciones	49
Bibliografía.....	50
Anexos.....	65

Índice de tablas

Tabla 1. Tratamientos pregerminativos en semillas de <i>Solanum betaceum</i>	19
Tabla 2. Tratamientos para evaluación de respuesta de dos explantes de <i>Solanum betaceum</i> .	23
Tabla 3. Estado físico del medio de cultivo y concentraciones de ANA, evaluados durante la fase de multiplicación de <i>Solanum betaceum</i>	26
Tabla 4. Medianas para las variables días a la germinación, porcentaje de germinación, número de hojas, color de hojas y porcentaje de contaminación bacteriana en semillas de <i>Solanum betaceum</i> , para los tratamientos pregerminativos.	29
Tabla 5. Medianas para las variables porcentaje de respuesta, número de hojas, color de hojas, porcentaje de callogénesis, porcentaje de contaminación bacteriana y porcentaje de contaminación fúngica para los explantes de <i>Solanum betaceum</i>	36
Tabla 6. Medianas para las variables porcentaje de brotación, número de hojas y color de hojas, en vitroplantas de <i>Solanum betaceum</i>	41

Índice de figuras

Figura 1. Plantas madre aclimatadas para la obtención de yemas de <i>Solanum betaceum</i>	17
Figura 2. Explantes nodales de <i>Solanum betaceum</i> , durante el protocolo de desinfección. ...	18
Figura 3. Escala colorimétrica para la variable color de hojas de <i>Solanum betaceum</i>	21
Figura 4. Gráficos box plot para A) Días a la germinación y B) Porcentaje de germinación, en la evaluación de protocolos pregerminativos en <i>Solanum betaceum</i>	30
Figura 5. Dinámica de germinación (%) respecto a protocolos pregerminativos evaluados en semillas de <i>Solanum betaceum</i> , durante 48 días.	31
Figura 6. Gráficos box plot para las variables A) número de hojas y B) color de hojas, durante la evaluación de protocolos pregerminativos en <i>Solanum betaceum</i>	33
Figura 7. Promedio del número de hojas respecto a protocolos pregerminativos evaluados en semillas de <i>Solanum betaceum</i> , durante 48 días.	34
Figura 8. Gráfico box plot para porcentaje de contaminación bacteriana evaluado durante fase de protocolos pregerminativos en <i>Solanum betaceum</i>	35
Figura 9. <i>Solanum betaceum</i> en fase de introducción.	37
Figura 10. Gráfico de dispersión de puntos para el número de tallos producidos por el explante semilla (S) y yema (Y) en <i>Solanum betaceum</i> , durante la fase de introducción al medio.	38
Figura 11. Promedio de respuesta morfogénica en yemas de <i>Solanum betaceum</i> durante 19 días.	40
Figura 12. Gráfico box plot para la variable brotación en la fase de multiplicación de vitroplantas de <i>Solanum betaceum</i> ,.....	42
Figura 13. Número de hojas promedio de <i>Solanum betaceum</i> según el estado físico del medio de cultivo, durante 4 semanas.	44
Figura 14. <i>Solanum betaceum</i> en fase de multiplicación. A) Explantes bajo el tratamiento M1C2. B) Explantes bajo el tratamiento M2C3.....	45

Figura 15. Índice de multiplicación en yemas de <i>Solanum betaceum</i> para el estado físico del medio, concentración de ANA e interacción de ambas variables.	46
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Índice de anexos

Anexo 1. Prueba de Kruskal-Wallis en fase de protocolos pregerminativos aplicados a semillas de <i>Solanum betaceum</i>	65
Anexo 2. Prueba de Kruskal-Wallis en fase de introducción al medio de cultivo de vitroplantas de <i>Solanum betaceum</i>	67
Anexo 3. Prueba de Kruskal-Wallis en fase de multiplicación de vitroplantas de <i>Solanum betaceum</i>	68

Resumen

La tecnología del cultivo *in vitro* tiene un gran potencial para producir plantas de calidad superior, aislamiento de variantes útiles en genotipos de alto rendimiento bien adaptados con mejor resistencia a las enfermedades y capacidades de tolerancia al estrés. El presente estudio fue conducido para contrastar tres tratamientos pregerminativos sobre semillas de *Solanum betaceum*, diferenciar la respuesta de dos explantes en la etapa de introducción y determinar el medio de cultivo óptimo en etapa de multiplicación. Al evaluar los tratamientos pregerminativos, el tratamiento PG3 (imbibición por 24 horas) obtuvo los mejores resultados, con 12 días hasta la emisión de la radícula y 100 % de germinación; para la valoración de explante, las yemas axilares obtuvieron un mayor porcentaje de respuesta morfogénica con 100 %, frente a las semillas con 50 %. En cuanto al medio de cultivo en la fase de multiplicación, ambos estados físicos (semisólido y bicápico) obtuvieron 100 % de brotación, sin embargo el color óptimo y el mayor número de hojas se obtuvo con el medio semisólido; ANA en concentración de 0,5 ppm produjo el mayor número de hojas. Al evaluar la interacción de estado del medio de cultivo y concentración de ANA, M1C2 (semisólido, 0,5 ppm ANA) resultó ser la combinación que produjo el mayor número de hojas (2), y M1C3 (semisólido, 1 ppm ANA) obtuvo la coloración óptima (5/5), las interacciones M1C1 y M1C2 produjeron el mayor índice de multiplicación para *vitroplantas* de *Solanum betaceum*.

Palabras Clave: Tomate de árbol; germinación; ácido 1-naftalenacético; gelificante; multiplicación.

Abstract

Plant tissue culture has great potential to produce excellent quality plants, segregation of advantageous variants in genotypes with enhanced disease and stress resistance abilities. This study was conducted to contrast three pre-germination treatments on *Solanum betaceum* seeds, differentiate the response of two explants at establishment stage and determine the optimal culture medium at multiplication stage. The best results were obtained by the PG3 treatment (hydropriming for 24 hours), with 12 days until the emission of the radicle and germination of 100 %; regards to explant evaluation, axillary buds obtained the highest percentage of response (100 %) compared to seeds with 50 %. In the multiplication period, both physical states (semi-solid and bi-captic) obtained 100 % of shoot development, however the optimal color and the highest number of leaves was obtained with the semi-solid medium; NAA at a concentration of 0,5 ppm produced the highest number of leaves. When evaluating the interaction of state of the culture medium and concentration of NAA, M1C2 (semisolid, 0,5 ppm NAA) turned out to be the combination that produced the highest number of leaves (2), and M1C3 (semisolid, 1 ppm NAA) obtained the optimal coloration (5/5), M1C1 and M1C2 interactions produced the highest multiplication index.

Keywords: Tamarillo; germination; 1-Naphthaleneacetic acid; gelling agent, multiplication stage.

Introducción

Solanum betaceum llamado comúnmente tamarillo, es una especie vegetal del territorio andino (Zhao Li, Scott, Hemar, Zhang, & Otter, 2018). Esta especie es usada principalmente por sus frutos comestibles con alto contenido nutricional (Orqueda et al., 2020). Se ha demostrado que el fruto de tomate de árbol posee sustancias fenólicas que dificultan la progresión del cáncer al interferir con cada una de las etapas de la carcinogénesis (Das, Avasthe, & Ghosh, 2018); y gracias a su capacidad para acumular metales pesados como el cadmio, esta especie incluso puede ser usada como indicador en estudios sobre contaminación ambiental (Montero-Jiménez et al., 2019).

En el Ecuador este cultivo presenta graves problemas fitosanitarios que ocasionan pérdidas monetarias a poblaciones de bajos recursos económicos (Pérez, 2017), varios patógenos se propagan por semilla, principal método de propagación convencional del tomate (Prohens & Nuez, 2001); razón por la cual se busca producir plantas sanas vía cultivo *in vitro*. La producción comercial de plantas mediante técnicas de micropropagación, tiene varias ventajas sobre los métodos tradicionales de propagación a través de semillas, corte, injerto y capas de aire, etc. Además de ser un proceso de propagación rápida, puede conducir a la producción de plantas libres de patógenos (Hussain, Ahmed, Nazir, & Ullah, 2012). El cultivo de tejidos vegetales debido a sus diversos beneficios se ha utilizado como una plataforma importante para la producción de metabolitos secundarios (Kolewe, Gaurav, & Roberts, 2008). Los cultivos de callos han ganado potencial comercial para la fabricación de metabolitos secundarios de importancia terapéutica (Wu, Karioti, Rohr, Bilia, & Efferth, 2016).

Se pueden considerar diferentes tipos de cultivos, dependiendo del explante elegido; en el caso del explante semilla se pueden aplicar tratamientos pregerminativos, antes o después de haberse desarrollado un protocolo de desinfección, su objetivo es mejorar la tasa de germinación sin afectar el desarrollo de las plántulas, como el primer paso para el cultivo (González-López &

Casquero, 2014). Los procesos pregerminativos inducen un estado fisiológico particular en las semillas, por lo que se han convertido en una estrategia prometedora para mejorar el comportamiento de la planta en el campo (Lutts *et al.*, 2016).

En la fase de introducción, el objetivo es ubicar los explantes selectos en el medio de cultivo evitando la contaminación y proporcionando un entorno que promueva la germinación o en el caso de yemas, la producción de brotes (Zimmerman, Griesbach, Hammerschlag, & Lawson, 1986). Al finalizar esta fase del cultivo de tejidos vegetales, se puede continuar con la etapa de multiplicación; se espera que cada explante se haya expandido en un grupo de pequeños brotes, estos se separan y se trasplantan a un nuevo medio de cultivo, para maximizar la cantidad de brotes producidos (Hartmann, Kester, Davies Jr., & Geneve, 2010).

El presente estudio fue conducido en el cultivo *in vitro* de tomate de árbol, para evaluar tratamientos pregerminativos, diferenciar la respuesta de dos explantes en la fase de introducción y determinar el medio de cultivo óptimo en la fase de multiplicación.

Como hipótesis del trabajo, se plantea que el presente protocolo para introducción y multiplicación, permite generar vitroplantas de *Solanum betaceum* con buen estado de sanidad a partir de los explantes de semilla y yema.

Capítulo 1

1 Marco conceptual

1.1 *Solanum betaceum*

1.1.1 Localización mundial y nacional

El tomate de árbol (*Solanum betaceum*) es originario principalmente de Sudamérica (regiones andinas de Colombia, Perú, Chile, Ecuador y Bolivia) (Wang & Zhu, 2020). Produce frutos comestibles con un interesante mercado en crecimiento en su zona de origen, así como en otras partes del mundo (Orqueda *et al.*, 2020). En nuestro país, la mayoría de frutos son producidos por pequeños y medianos productores de la Sierra, quienes se han visto limitados para expansión del cultivo y la exportación del fruto debido a su baja aptitud y susceptibilidad a plagas y enfermedades (Arroyo *et al.*, 2016).

1.1.2 Descripción

El tomate de árbol es una especie de árbol pequeño o arbusto perenne (2–4 m de altura), del género *Solanum* en la familia Solanaceae (Tropicos.org, 2020).

El árbol generalmente forma un solo tronco vertical con ramificaciones adyacentes, sus flores tienden de estos (Prohens & Nuez, 2001). Sus hojas son simples, grandes, con un fuerte aroma característico, las flores son de color rosa blanquecino y forman grupos de 10 a 14; su fruto pertenece al grupo de frutas semi-ácidas, es una baya de forma ovoide de 4,5 a 7 cm de longitud que presenta una coloración naranja, roja, o morada cuando madura (Buono, Abdo, Hamity, Ansonaud, & Ferreyra, 2019).

Los árboles comienzan a reproducirse dentro de los 12-18 meses de plantación, alcanzando un pico de producción a los 3-4 años, que se mantiene hasta que la planta alcance los 8 años, sin

embargo, si la planta está bien manejada puede vivir y producir hasta los 12 años (Acosta-Quezada *et al.*, 2016).

1.1.3 Importancia del cultivo

Ecuador tiene aproximadamente 40 sitios de producción de tomate de árbol, con un área de cultivo total de 260000 hectáreas, que son atendidas por una sola empacadora. En 2014, el Ecuador exportó aproximadamente 5,1 toneladas métricas (Tm) de fruta fresca a Alemania, Canadá, España, Holanda, Italia y Japón en más de 130 envíos pequeños (Animal and Plant Health Inspection Service USDA, 2018). La producción nacional en 2010 fue de 10545 Tm en balance con la producción para el año de 2015 que fue de 21163 Tm, duplicándose los datos de superficie cosechada y producción dentro de 5 años (Dávila, 2016).

1.1.3.1. Propiedades y beneficios

Los frutos del tomate de árbol son una fuente de compuestos bioactivos apreciados, como ácido rosmarínico, ácidos cafeoilquínicos, taninos condensados, antocianinas, ácido ascórbico y fibra dietética soluble; sus valiosos compuestos también están presentes en la piel, pulpa y semillas en polvo, convirtiéndolos en una excelente fuente de nutraceuticos (Orqueda *et al.*, 2020). El tamarillo es considerado una especie con gran potencial nutricional y productivo, ya que por ser un fruto infrecuente y privilegiado de los Andes, representa una opción productiva frente a las nuevas tendencias del comercio (Villares *et al.*, 2018).

Los antioxidantes en las frutas de tomate de árbol, como las antocianinas, podrían funcionar como aditivos alimentarios naturales que extienden la vida útil de los productos alimenticios al prevenir o retrasar la oxidación de los lípidos (Castro-Vargas, Benelli, Ferreira, & Parada-Alfonso, 2013). Las hojas de la planta se usan en la medicina popular ecuatoriana como remedio para el dolor de garganta (Walley & Knapp, 2011).

Según las observaciones de laboratorio, los extractos de proteasa cruda de la fruta de tomate de árbol se pueden usar como un agente de coagulación similar al cuajo natural en geles de leche desnatada reconstituidos, entre otros usos (Li, Scott, Otter, Zhou, & Hemar, 2018).

1.1.4. Problemas fitosanitarios

Revelo, Mora, Gallegos, & Garcés (2008), enlistan los siguientes problemas fitosanitarios en el cultivo de *Solanum betaceum*: *Colletotrichum gloeosporioides*, virosis, *Phytophthora infestans*, *Oidium* sp., *Fusarium solani*, *Leptoglossus zonatus*, *Alternaria* sp., *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Aphis* sp., *Meloidogyne incognita*, *Agrotis* sp., *Phyllophaga* sp. Entre los problemas mencionados, los de mayor importancia económica son la Antracnosis y las virosis (Jaramillo, Álvarez, & Marín, 2012).

1.1.4.1. Antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*)

En el tomate de árbol, la antracnosis afecta directamente a la fruta, produciendo manchas aceitosas que se vuelven negras a medida que crecen; en cultivos comerciales que reciben aplicaciones continuas de fungicidas, las pérdidas varían del 10 al 25 % de la fruta cosechada; cuando las medidas de manejo no son eficientes, las pérdidas pueden llegar hasta el 80 o incluso el 100 % de la cosecha; este es, por lo tanto, el más costoso de todos los problemas del cultivo, muchas veces determina su abandono o sustitución (Martínez, Hío, Osorio, & Torres, 2009).

1.1.4.2. Virosis

Es provocada por un grupo de al menos cuatro virus trascendentales (ToMV, PLRV, Potyvirus y CMV) y otros que aparentemente presentan menores niveles de incidencia (ToRSV, AMV y TSWV) (Jaramillo *et al.*, 2012). En el Ecuador, los virus han sido responsables de pérdidas de hasta del 50 % en algunos cultivos (Pérez, 2017).

1.1.5. Propagación

1.1.5.1 Propagación sexual

Aunque el tomate de árbol puede propagarse vegetativamente, el sistema de propagación más común y rutinario es por semillas (Prohens & Nuez, 2001). La etapa de germinación generalmente se completa en un periodo de 14 a 28 días, dependiendo de la temperatura y el tipo de sustrato de germinación (Acosta-Quezada *et al.*, 2016).

El porcentaje de germinación suele ser bajo de no seleccionarse las semillas de los mejores frutos y plantas madres (Morton & Dowling, 1987). Al ser plantas alógamas, la propagación a través de semillas no es una opción viable para la multiplicación de genotipos de élite (Rathore, Yadav, Yadav, Kheni, & Jha, 2015). En las plantas derivadas de semillas, la producción de fruta comienza después de aproximadamente 18 meses, mientras que las plantas obtenidas de esquejes alcanzan la madurez antes, favoreciendo con una producción temprana (Correia & Canhoto, 2012). Las semillas forman un hábitat importante para los microorganismos, albergando una amplia gama de microorganismos tanto patógenos como benéficos; pueden tener un efecto persistente en plantas producidas a partir de estas (Shahzad, Khan, Bilal, Asaf, & Lee, 2018).

1.1.5.2. Propagación asexual

Esta se practica mediante esquejes e injertos de púa terminal que son enterrados en el sustrato; se recomiendan portainjertos de especies resistentes a nematodos y pudrimiento radicular, como *Nicotiana glauca*, *Solanum auriculatum* y *Solanum hispidum* (Feicán-Mejía, Encalada-Alvarado, & Becerril-Román, 2016).

La reproducción asexual provoca la transmisión de patógenos causantes de enfermedades de la planta madre a sus clones (Rathore *et al.*, 2015). Esta es la razón por la que el tomate de

árbol se ha considerado un cultivo de productividad limitada, debido a la presencia de problemas fitosanitarios transmitidos mediante los métodos tradicionales de propagación, lo que conduce a buscar métodos de mayor eficiencia como el cultivo *in vitro* (Criollo, Insuasti, & Delgado, 2016).

1.2. Cultivo *in vitro*

1.2.1. Antecedentes del cultivo *in vitro* de *Solanum betaceum*

Obando & Jordan (2001), examinaron el potencial de regeneración *in vitro* en tomate de árbol, se observaron respuestas morfogénicas en una serie de órganos, principalmente a través de embriogénesis somática, brotes adventicios de explantes foliares y formación de raíces en brotes axilares que conducen a plántulas; se observó oscurecimiento de las yemas axilares en algunos tratamientos, lo cual terminó en necrosis.

Contreras & Almeida (2003), llevaron a cabo la micropropagación de plantas de *Solanum betaceum* partiendo de cotiledones e hipocótilos, mas no se produjeron plantas completas desde el explante yema.

Kahia *et al.* (2015), desarrollaron un protocolo de propagación de tomate de árbol, el medio suplementado con bencilaminopurina (BAP) 40 mM, fue el más efectivo para inducir brotes múltiples a partir de explantes foliares, produciendo $4,67 \pm 0,15$ brotes por explante; las plántulas regeneradas se trasplantaron al invernadero y se registró una tasa de supervivencia del 90 %.

Se han establecido eficientemente cultivos embriogénicos en suspensión comenzando con 40 mg de células en 20 mL de medio líquido. Además, han sido empleadas técnicas fluorométricas y de espectrometría de masas para identificar proteínas extracelulares, su actividad hidrolítica y las principales clases de proteasas secretadas en los medios de cultivos de callos

embriogénicos o callos no embriogénicos (Alves, Caeiro, Correia, Veríssimo, & Canhoto, 2017).

En el estudio conducido por Copatti, Loy, Cruz, & Schwartz (2016), se analizó la respuesta de tejido de *Solanum betaceum* previamente establecido *in vitro* a distintas concentraciones de auxinas y citoquininas. Gran parte del trabajo realizado en tomate de árbol está relacionado con la inducción de embriogénesis somática; la propagación vegetativa aún sigue en desarrollo (Correia & Canhoto, 2012).

1.2.2. Medio de cultivo

Los explantes se cultivan en un recipiente lleno de medio de cultivo estéril que contiene los nutrientes necesarios, carbohidratos y reguladores del crecimiento; tanto el medio sólido como el líquido (Hussain *et al.*, 2012), o combinaciones como los medios bicápicos. Otros compuestos agregados para un propósito específico son los aminoácidos, compuestos orgánicos de nitrógeno, extractos vegetales y antibióticos, entre otros (T. J. Lee, Zobayed, Firmani, & Park, 2019).

El medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) se usa ampliamente en el cultivo de tejidos vegetales de muchas especies; este contiene sales principales (macronutrientes), sales menores (micronutrientes), vitaminas y compuestos orgánicos (Trigiano & Gray, 2016).

El pH del medio es un factor esencial, puesto que impacta tanto el crecimiento de las plantas, como el desempeño de los reguladores de crecimiento de las plantas; este se debe ajustar a un valor entre 5,4 – 5,8 (Hussain *et al.*, 2012).

Uno de los factores más importantes para llevar al dominio en la tecnología de cultivo de células, tejidos y órganos se relaciona con la elección del medio de cultivo, ya que no existe

un medio ideal que apoye el desarrollo de todo espécimen de tejido (Ponmurugan & Kumar, 2012).

1.2.2.1. Estado físico del medio de cultivo (Gelificante)

Se pueden usar o no agentes gelificantes en diversas proporciones para obtener diferentes estados físicos del medio de cultivo (Lee *et al.*, 2017), que pueden ser líquido, semi sólido o combinados (medio bicápico). Un medio bicápico, se conforma por una capa de medio semisólido en la parte inferior, y una capa de medio líquido en la parte superior., proveyendo características de ambos estados.

El tipo de medio (líquido o semisólido), puede afectar directamente el proceso de enraizamiento. Aunque el medio líquido influye positivamente en la disponibilidad de agua, nutrientes, hormonas y niveles de oxígeno, la gran mayoría de los protocolos para la micropropagación se han establecido en medios semisólidos (Souza & Pereira, 2007).

Para los medios gelificados, se ha usado el agar ampliamente ya que tiene propiedades gelificantes convenientes y estabilidad durante el cultivo de tejidos, a pesar de su alto costo (Lee *et al.*, 2017).

Las principales diferencias entre los productos de agar se deben a las impurezas, su nivel y composición, que pueden variar según los fabricantes (Titan Biotech Ltd, 2015).

También cabe mencionar que la usanza de productos gelificantes en los medios de cultivo abarcan entre el 70 y 90 % del coste del medio, por lo cual los costos del cultivo *in vitro* disminuyen considerablemente al usarse medios líquidos (Albany *et al.*, 2015).

1.2.2.2. Reguladores de crecimiento

En cotejo con los animales, las plantas universalmente poseen un profundo nivel de flexibilidad del desarrollo y muestran varios tipos de regeneración de tejidos u órganos. Este potencial regenerativo puede ser optimizado mediante reguladores de crecimiento *in vitro* suministrados de manera exógena, en donde el equilibrio entre la auxina y la citoquinina determina el destino del desarrollo de los órganos en regeneración (Ikeuchi, Ogawa, Iwase, & Sugimoto, 2016). Debido a los primeros intentos de cultivar células vegetales o tejidos *in vitro*, se demostró que estas dos fitohormonas, desempeñan papeles importantes en la estimulación de la división celular y la vigilancia de la progresión del ciclo celular. Generalmente, una relación auxina:citoquinina de 10:1, induce el rápido crecimiento de callo indiferenciado, una relación de 100:1 conduce al desarrollo de la raíz y una relación de 4 favorece el desarrollo de los brotes (Lima, da Silva Campos, Willadino, Câmara, & Vianello, 2012).

En general, la literatura informa sobre el uso de auxinas, citoquininas, giberelinas y diferentes interacciones, para fomentar el desarrollo *in vitro* de órganos específicos. Las plantas enteras o plántulas, cultivos de órganos o cultivos en suspensión desdiferenciados propagados a partir de callos, pueden cultivarse asépticamente en un medio de cultivo definido; estos diferentes tipos de cultivos *in vitro* se pueden interconvertir utilizando técnicas establecidas, la mayoría de las cuales dependen de concentraciones específicas de reguladores de crecimiento (Chandra, Lata, & Varma, 2012).

1.2.2.2.1. Auxinas

La auxina es una hormona vegetal esencial conocida por proporcionar información direccional y posicional para el desarrollo anatómico y fisiológico de las plantas (Yan, Wang, Zhou, & Hao, 2018). Se han identificado cuatro auxinas nativas en plantas, siendo el ácido indol-3-

acético (AIA) la forma más abundante; la distribución de auxina dentro de los tejidos vegetales está regulada por las vías de biosíntesis, inactivación y transporte (Lavy & Estelle, 2016). Se creía que la auxina se sintetizaba, conjugaba y degradaba principalmente en el citoplasma; recientemente, se ha descubierto que este proceso también ocurre en orgánulos subcelulares, como el retículo endoplásmico o la vacuola (Casanova-Sáez & Voß, 2019).

Las auxinas son termoestables a 110-120 °C por hasta 1 h; sin embargo, AIA es destruido por pH bajo, luz, oxígeno y peróxidos. Las auxinas sintéticas como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido 1-naftalenacético (ANA), son más estables que AIA, que es la auxina natural (Smith, 2013). Las auxinas se usan generalmente en cultivos de células vegetales en un rango de concentración de 0,01-10 ppm; cuando se agregan en concentraciones apropiadas, son capaces de controlar el crecimiento celular, la turgencia de los tejidos, la división de las células, el desarrollo de raíces de anclaje, la contención de la formación de brotes, la inducción de embriogénesis y callogénesis (Ponmurugan & Kumar, 2012).

Dado que la división y expansión celular requiere una regulación espacio-temporal, una distribución adecuada de auxina a través del tejido es muy importante para coordinar el crecimiento y el desarrollo del tejido; la homeostasis de las auxinas está asegurada no solo por el transporte apropiado, sino que también implica biosíntesis *de novo*, conjugación, almacenamiento, oxidación y catabolismo, todo lo cual debe realizarse de manera coordinada (Olatunji, Geelen, & Verstraeten, 2017). La mayoría de las células vegetales requieren las auxinas AIA, ANA, 2,4-D o Ácido indolbutírico (AIB) para la división y el inicio del enraizamiento; a altas concentraciones, la auxina puede suprimir la morfogénesis. La auxina 2,4-D se usa ampliamente para la inducción de callos; AIA, AIB y ANA se usan para la inducción de raíces y brotes (Sakina, Syaiful Anwar, & Kusmiyati, 2019; Weijers, Nemhauser, & Yang, 2018).

Ácido 1-naftalenacético

El regulador de crecimiento ANA ha sido principalmente usado por su importancia en la proliferación celular *in vitro*; siendo demostrada su acción en el aumento del índice de multiplicación en cultivares como orquídeas del género *Dendrobium* (Elmongy, Cao, Zhou, & Xia, 2018).

1.2.3. Fases del cultivo *in vitro*

1.2.3.1. Protocolo de desinfección

La desinfección del material vegetal es uno de los pasos más importantes del protocolo de cultivo de tejidos. En este proceso, se intenta eliminar los contaminantes microbianos de la superficie y el interior del material vegetal, lo que le da al explante una oportunidad de sobrevivir *in vitro* (Teixeira, Winarto, Dobránszki, & Songjun, 2015). Este proceso debe ser eficiente para eliminar contaminantes, con un daño mínimo a las células vegetales (Iliev, Gajdošová, Libiaková, & Jain, 2010).

El brote vegetativo sirve como un buen material de partida (explante) para el cultivo *in vitro* de plantas; sin embargo, las fuertes cargas de contaminación microbiana como las bacterias y las esporas de hongos que albergan, especialmente las yemas axilares, hacen problemático el establecimiento de cultivos *in vitro*; este problema de contaminación microbiana generalmente se supera mediante la desinfección efectiva de los explantes en la superficie, entre otras técnicas asépticas (Bello, Esan, & Obembe, 2018).

Tradicionalmente, el método de desinfección utiliza soluciones de hipoclorito de sodio, que generalmente representa una buena opción para la limpieza de tejidos. Sin embargo, ese procedimiento depende de varios factores, incluyendo la fuente del explante, la edad de la planta madre, la variedad y el genotipo (Lazo-Javalera *et al.*, 2016).

1.2.3.2. Protocolo pregerminativo

En el caso del explante semilla se pueden aplicar tratamientos pregerminativos, antes o después de haberse desarrollado un protocolo de desinfección. El objetivo de un protocolo pregerminativo es mejorar la tasa de germinación sin afectar el desarrollo de las plántulas, como el primer paso para el cultivo (González-López & Casquero, 2014).

La estructura dura de la cubierta de la semilla puede ser la razón de la latencia de la semilla dependiendo de la especie, lo que dificulta la absorción de agua durante la germinación; tratamientos de escarificación física, mecánica o química son útiles para resolver las condiciones de latencia en las semillas (Al Zoubi, 2020). La utilización de procedimientos para acabar con la latencia del tegumento causa una buena respuesta al tiempo y un porcentaje mayor de germinación, una de las estrategias es hidratar las semillas durante 24 h a temperatura ambiente (Abril-Saltos, Ruiz-Vásquez, Alonso-Lazo, & Cabrera-Murillo, 2017).

La eficiencia del procedimiento de escarificación depende de la habilidad y la práctica del técnico; si la escarificación es demasiado profunda, puede dañar el eje embrionario o, si es demasiado superficial, puede no ser suficiente para superar las barreras mecánicas que bloquean la germinación de las semillas (Martins, da Silva, Durigan, & Vieira, 2019).

Los procesos pregerminativos inducen un estado fisiológico particular en las semillas y se han convertido en una estrategia prometedora para mejorar el comportamiento de la planta en el campo; existe un gran interés para los agricultores y las compañías de semillas para encontrar tratamientos pregerminativos baratos adecuados, pero también para identificar con precisión las propiedades agronómicas mejoradas como resultado de la aplicación de estos en especies cultivadas (Lutts *et al.*, 2016).

1.2.3.3. Fase de establecimiento *in vitro*

La meta de esta etapa es colocar los explantes seleccionados en el medio de cultivo evitando la contaminación y proporcionando un entorno que promueva la germinación o la producción de brotes (Zimmerman et al., 1986).

Dependiendo del tipo de explante, la formación de brotes puede iniciarse a partir de yemas apicales y axilares; también semillas sexuales, hojas o peciolo (Murillo-Gómez, Hoyos, & Chavarriaga, 2017). Por lo general, se requieren de 4 a 6 semanas para completar esta etapa y generar explantes que estén listos para pasar a la siguiente etapa (Hartmann et al., 2010).

1.2.3.4. Fases de multiplicación y enraizamiento

En la etapa de la multiplicación, cada explante se ha expandido en un grupo de pequeños brotes; estos se separan y se trasplantan a un nuevo medio de cultivo, se busca maximizar la cantidad de brotes producidos (Hartmann *et al.*, 2010). La etapa de enraizamiento puede ocurrir simultáneamente en los mismos medios de cultivo utilizados para la multiplicación de los explantes; en algunos casos es necesario cambiar los medios, incluida la modificación nutricional y la composición del regulador del crecimiento, para inducir el enraizamiento y el desarrollo de un fuerte crecimiento de la raíz (Hussain *et al.*, 2012).

1.2.3.5. Fase de aclimatación

En el caso de las plantas regeneradas *in vitro*, estas requieren someterse a un proceso de adaptación (aclimatación) en el invernadero antes de la transferencia a condiciones de campo, para lo cual es necesaria la elección de un sustrato y vigilancia de las condiciones climáticas, adecuados, para la especie con la que se trabaja (Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2018). Los brotes desarrollados en el cultivo *in vitro* a menudo se han producido en alta humedad y baja intensidad de luz, lo que hace que sus hojas posean menos ceras epicuticulares con una

composición química alterada (falta de cera superficial) a comparación de las plantas cultivadas en el campo; y en algunas plantas, los estomas de las hojas producidas *in vitro* también pueden ser atípicos e incapaces de cerrarse por completo bajo una humedad relativa baja (Ehirim *et al.*, 2014). En esta fase, los ajustes estructurales y fisiológicos de las plántulas a las condiciones *ex vitro* son cruciales para el éxito en campo (Santa Cruz, Graciano-Ribeiro, Batista, Aquino, & Copati, 2006). Las decisiones tomadas en esta fase son de crítica importancia debido a la diferencia entre las condiciones *in vitro* y las de invernadero (Suryani & Sari, 2019), con la finalidad de aclimatar plantas exitosamente.

Capítulo 2

2 Metodología

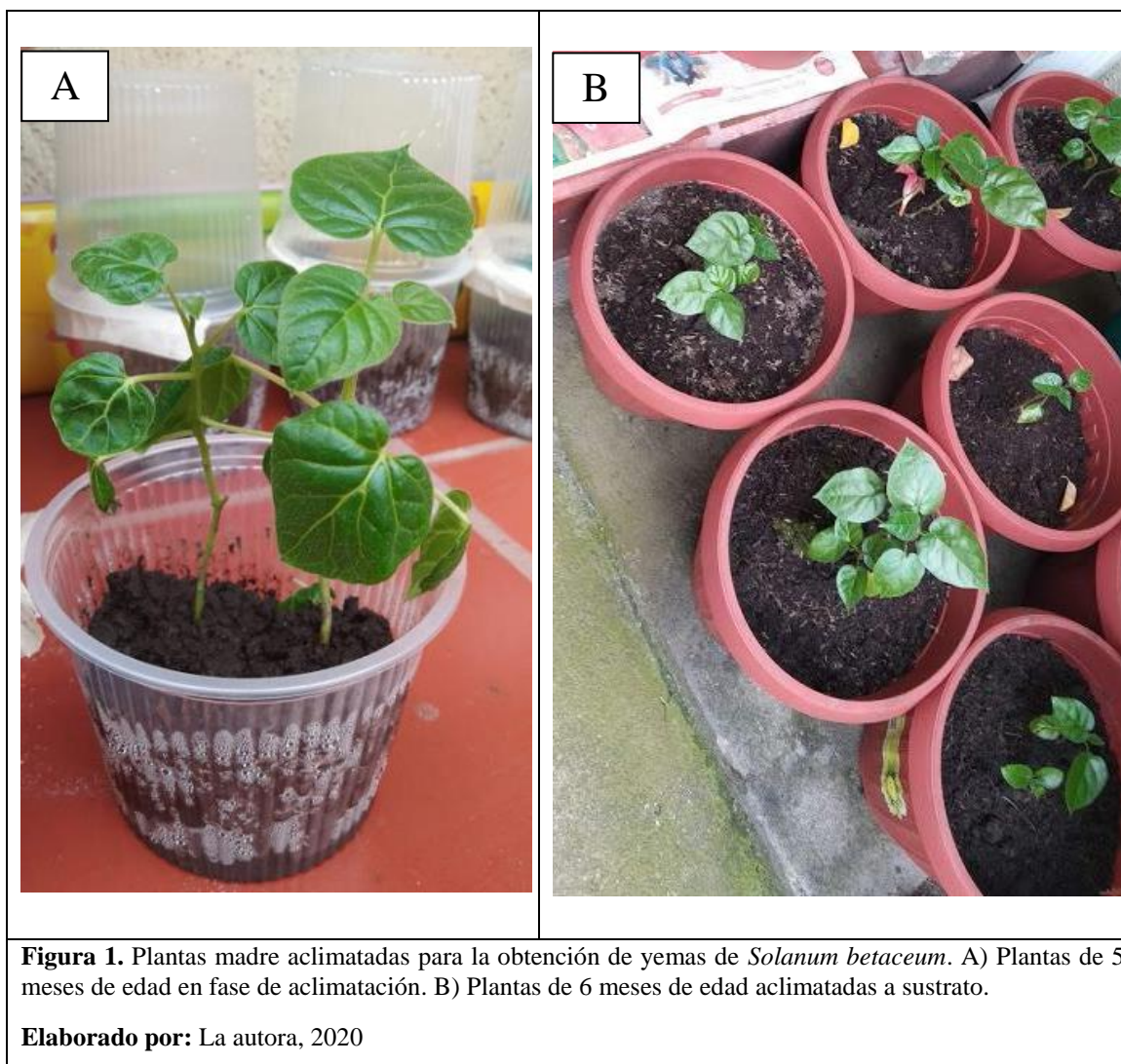
2.1 Localización

El proyecto fue desarrollado en la Universidad Politécnica Salesiana, en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la carrera de Biotecnología de los Recursos Naturales, situado en la provincia de Pichincha, del cantón Quito, Parroquia el Girón. Las vitroplantas fueron mantenidas en la cámara de crecimiento bajo condiciones controladas con un fotoperiodo de 16/8 y una temperatura de 24 ± 2 °C.

2.2 Elección del explante y Protocolo de desinfección

El material vegetal de partida fue semillas y yemas de *Solanum betaceum*. Las semillas se adquirieron en el cantón Quito.

Las yemas fueron obtenidas de vitroplantas previamente aclimatadas, de 9 meses de edad, mantenidas bajo invernadero en la provincia de Pichincha, cantón Quito (Figura 1). Para el traslado de las yemas hasta el laboratorio se cortaron varetas de 30 cm de longitud, todas las hojas y yemas apicales se removieron; las varetas se envolvieron en papel periódico y se humedecieron con la ayuda de un atomizador y agua corriente. La recolección del material vegetal se realizó 4 horas antes de la siembra en el medio de cultivo para reducir el riesgo de fenolización de los tejidos.



2.2.1 Protocolo de desinfección de semillas

En el protocolo de desinfección las semillas se inmergieron en yodo al 1,33 % durante 15 minutos, a continuación, se efectuaron 3 lavados con agua destilada estéril. Las mismas se sumergieron en hipoclorito de sodio al 1,5 % v/v por 10 minutos, se ejecutaron 5 lavados con agua destilada estéril. De acuerdo al procedimiento realizado por Criollo *et al.* (2016), la siembra de estas semillas se realizó en cabina de flujo, anticipadamente desinfectada con alcohol al 70 % y exposición a luz ultravioleta (UV) a lo largo de 15 min, contiguo al instrumental a manejar.

2.2.2 Protocolo de desinfección de yemas

Las varetas de 30 cm se cortaron por la mitad y enjuagaron con agua corriente, fueron colocadas en un recipiente de 2 L de capacidad con solución de detergente en polvo al 1 % P/V, en agitación constante por 10 minutos. Se redujo la longitud de los explantes a 3 cm y estos se sumergieron en una solución antioxidante compuesta de 100 ppm de Ácido cítrico y 100 ppm de Ácido ascórbico (solución de enjuague) (Figura 2). A continuación, los explantes fueron sumergidos en alcohol al 70 % durante 30 segundos, seguido por un enjuague, luego se realizó una sumersión en tintura de yodo al 1,3 % durante 30 segundos; y se enjuagó nuevamente. Finalmente, los explantes se mantuvieron por 15 segundos en una solución de Sulfato de cobre pentahidratado 1 mL/L para luego ser enjuagados.



Figura 2. Explantes nodales de *Solanum betaceum*, durante el protocolo de desinfección.

Elaborado por: La autora, 2020

2.3 Protocolo Pregerminativo

Se contrastaron tres tratamientos pregerminativos sobre las semillas, previo a la fase de introducción con la finalidad de obtener un mayor porcentaje de germinación.

2.3.1 Tratamientos

Con la finalidad de determinar el mejor tratamiento pregerminativo, se evaluaron 3 protocolos, basados en el uso de imbibición en agua destilada estéril, agua oxigenada de 10 volúmenes, y escarificación (Tabla 1). Las semillas de *Solanum betaceum* fueron sembradas en medio MS (MS519) con concentración de sales al 50 %.

Tabla 1.

Tratamientos pregerminativos en semillas de *Solanum betaceum*.

Nomenclatura	Tratamiento pregerminativo (PG)
PG1	Agua oxigenada 10 vol. por 5 min con imbibición de 48 horas y lavado de lixiviado a las 24 horas
PG2	Escarificación e imbibición por 24 horas
PG3	Imbibición por 24 horas
PG0	Testigo

Elaborado por: La autora, 2019

2.3.2 Unidad experimental

La unidad experimental estuvo conformada por tubos Pyrex de 2 cm de diámetro con tapa rosca de 40 mL de volumen, con 2 semillas y 10 mL de medio de cultivo.

2.3.3 Análisis estadístico

2.3.3.1 Diseño experimental

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), con 13 repeticiones para cada tratamiento.

2.3.3.2 Análisis para prueba de normalidad

La prueba empleada para detectar las variables paramétricas y las variables no paramétricas fue el análisis de Shapiro Wilks, bajo el software InfoStat.

2.3.3.3 Kruskal-Wallis

La prueba de Kruskal-Wallis permitió analizar si las diferencias encontradas fueron o no significativas al 5 %. Una vez que se ha determinado que existen diferencias significativas entre las medianas, la prueba de rango post hoc permitió determinar qué medianas difieren.

2.3.4 Variables y métodos de evaluación

2.3.4.1 Días de germinación

La germinación fue evaluada cada 3 días, mediante observación sistémica, durante 48 días después de la siembra. Se contabilizó el número de días al que la semilla emitió la radícula.

2.3.4.2 Porcentaje de germinación

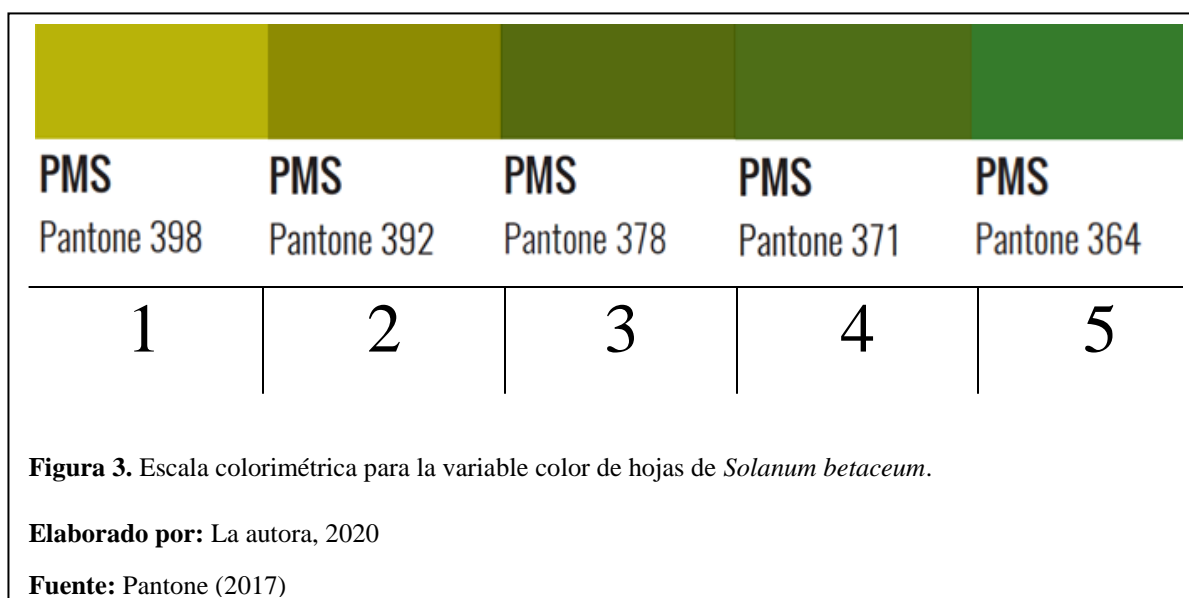
El porcentaje de germinación se obtuvo al cuantificar las semillas que han emitido la radícula en relación con la población total de cada tratamiento pregerminativo por 100. Se evaluó cada 3 días.

2.3.4.3 Número de hojas

Se contó el número de hojas (diámetro mínimo 0,8 cm) por explante cada 7 días, a través de observación sistémica hasta los 48 días después de la siembra.

2.3.4.4 Color de las hojas

La variable fue medida con una escala creada a partir de los colores observados en la lámina de la hoja *Solanum betaceum*, basada en el sistema de definición cromática llamado Pantone. Se calificó con 0 a las hojas cloróticas y la coloración verde oscura (PMS Pantone 364) fue valorada con 5, conforme se describe en la Figura 3. Se evaluó a los 48 días de iniciada la fase.



2.3.4.4 Porcentaje de contaminación bacteriana

El porcentaje de contaminación bacteriana se obtuvo mediante observación sistémica al cuantificarse las unidades experimentales con colonias (masas bacterianas en forma de pliegues, halos o rosetas) alrededor de los explantes o en el medio de cultivo, en relación con la población total de cada tratamiento pregerminativo por 100. Se evaluó cada 3 días hasta el final de la fase.

2.3.4.4 Porcentaje de contaminación fúngica

El porcentaje de contaminación fúngica se obtuvo mediante observación sistémica al cuantificarse las unidades experimentales con colonias aisladas o alrededor de los explantes, en relación con la población total de cada tratamiento pregerminativo por 100. Se evaluó cada 3 días hasta el final de la fase.

2.3.4.5 Porcentaje de fenolización

El porcentaje de fenolización se obtuvo mediante observación sistémica al cuantificarse las unidades experimentales que presentaron oscurecimiento de los tejidos y/o el medio de cultivo, como signo de la presencia de oxidación fenólica, en relación a la población total de cada tratamiento pregerminativo por 100. Se evaluó cada 3 días hasta finalizar la fase.

2.4 Fase de Introducción

Para la fase de introducción se usó el medio MS (MS519) con concentración de sales al 50 %. El medio fue enriquecido con 20 g/L de sucrosa, 6 g/L de Phyto Agar, y 50 ppm de ácido cítrico.

2.4.1 Tratamientos

Con la finalidad de determinar el mejor explante, se evaluó: semilla y yema (Tabla 2), en el medio previamente descrito.

Tabla 2.

Tratamientos para evaluación de respuesta de dos explantes de *Solanum betaceum*.

Nomenclatura	Explante
S	Semilla
Y	Yema

Elaborado por: La autora, 2019

2.4.2 Unidad experimental

La unidad experimental estuvo conformada por un tubo Pyrex de 2 cm de diámetro con tapa rosca de 40 mL de volumen, conteniendo una yema o dos semillas y 10 mL de medio de cultivo.

2.4.3 Análisis estadístico

2.4.3.1 Diseño experimental

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con 76 repeticiones para cada tratamiento.

2.4.3.2 Análisis para prueba de normalidad

La prueba empleada para detectar las variables paramétricas y las variables no paramétricas fue el análisis de Shapiro Wilks, bajo el software InfoStat.

2.4.3.3 Kruskal-Wallis

La prueba de Kruskal-Wallis permitió analizar si las diferencias encontradas fueron o no significativas al 5 %. Una vez que se ha concluido la existencia de diferencias significativas entre las medianas, la prueba de rango post hoc permitió determinar qué medianas difieren.

2.4.4 Variables y métodos de evaluación

2.4.4.1 Porcentaje de respuesta

Se valoró el porcentaje de respuesta al final de la fase, se estimó con 1 al explante con respuesta (germinación en el caso de semillas y brotación para yemas) y con 0 la ausencia de respuesta.

2.4.4.2 Número de hojas

Se contó el número de hojas (diámetro mínimo 0,8 cm) por explante cada 7 días, a través de observación sistémica durante 19 días.

2.4.4.3 Color de las hojas

La variable fue medida con una escala creada a partir de los colores observados en la lámina de la hoja *Solanum betaceum*, basada en el sistema de definición cromática llamado Pantone, se calificó con 0 a las hojas cloróticas y la coloración verde oscura (PMS Pantone 364) fue valorada con 5, conforme se describe en la Figura 3. Se evaluó a los 19 días de iniciada la fase.

2.4.4.4 Porcentaje de Callogénesis

El porcentaje de callogénesis se obtuvo mediante observación sistémica hasta el final de la fase. Se contó la cantidad de unidades experimentales con presencia de tejido callogénico (masa de células no diferenciadas), en relación con el total de la población para cada tratamiento por 100. Se evaluó cada 7 días.

2.4.4.5 Porcentaje de contaminación bacteriana

El porcentaje de contaminación bacteriana se obtuvo mediante observación sistémica al cuantificarse las unidades experimentales con colonias (masas bacterianas en forma de pliegues, halos o rosetas) alrededor de los explantes o en el medio de cultivo, en relación con la población total para cada tratamiento por 100. Se evaluó cada 7 días hasta el final de la fase.

2.4.4.6 Porcentaje de contaminación fúngica

El porcentaje de contaminación fúngica se obtuvo mediante observación sistémica al cuantificarse las unidades experimentales con colonias aisladas o alrededor de los explantes, en relación porcentual. Se evaluó cada 7 días hasta el final de la fase.

2.4.4.7 Porcentaje de fenolización

El porcentaje de fenolización se obtuvo mediante observación sistémica hasta el final de la fase. Se contó la cantidad de unidades experimentales con oscurecimiento de los tejidos como signo de la presencia de oxidación fenólica, en relación porcentual. Se evaluó cada 7 días.

2.5 Fase de Multiplicación

Los explantes provenientes de la etapa de introducción, se cultivaron en medio MS enriquecido con sucrosa 20 g/L, carbón activado 1 g/L, Phyto Agar 6 g/L y ácido cítrico 50 ppm; con la finalidad de favorecer el índice de multiplicación.

2.5.1 Factores de estudio

- a) Dos estados físicos del medio de cultivo: Medio semisólido y Medio bicápico.
- b) Tres concentraciones de ANA: 0 ppm, 0,5 ppm, y 1ppm.

2.5.2 Tratamientos

Con la finalidad de determinar el medio de cultivo óptimo, se sembraron explantes provenientes de la fase previa en medio MS, en estado físico semisólido y bicápico, con tres concentraciones de ácido 1-naftalenacético (Tabla 3).

Tabla 3.

Estado físico del medio de cultivo y concentraciones de ANA, evaluados durante la fase de multiplicación de *Solanum betaceum*.

Nomenclatura	Estado físico del medio de cultivo	ANA (ppm)
M1C1	Medio semisólido	0
M1C2	Medio semisólido	0,5
M1C3	Medio semisólido	1
M2C1	Medio bicápico	0
M2C2	Medio bicápico	0,5
M2C3	Medio bicápico	1

Elaborado por: La autora, 2019

2.5.3 Unidad experimental

Estuvo conformada por un contenedor plástico con tapa de 1 L de capacidad, conteniendo 3 explantes vegetativos y 100 mL de medio de cultivo.

2.5.4 Análisis estadístico

2.5.4.1 Diseño experimental

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), dispuesto en arreglo factorial 2x3 (2 estados físicos del medio de cultivo por 3 concentraciones de ANA), con 3 repeticiones para cada tratamiento.

2.5.4.2 Análisis para prueba de normalidad

La prueba empleada para detectar las variables paramétricas y las variables no paramétricas fue el análisis de Shapiro Wilks, bajo el software InfoStat.

2.5.4.3 Kruskal-Wallis

La prueba de Kruskal-Wallis permitió analizar si las diferencias encontradas fueron o no significativas al 5 %. Una vez que se ha concluido la existencia de diferencias significativas entre las medianas, la prueba de rango post hoc permitió determinar qué medianas difieren.

2.5.5 Variables y métodos de evaluación

2.5.5.1 Porcentaje de brotación

Se determinó la brotación (aparición de pequeñas hojas iniciales) en una relación porcentual de las mismas frente a la población total de cada tratamiento. Se evaluó cada 15 días durante 4 semanas.

2.5.5.2 Número de hojas

Se contó el número de hojas (diámetro mínimo 0,8 cm) por explante cada 15 días, a través de observación sistémica hasta finalizar esta fase, durante 4 semanas.

2.5.5.3 Color de las hojas

La variable fue medida con una escala creada a partir de los colores observados en la lámina de la hoja de *Solanum betaceum*, basada en el sistema de definición cromática llamado Pantone, se calificó con 0 a las hojas cloróticas y coloración verde oscura (PMS Pantone 364) fue valorada con 5, conforme se describe en la Figura 3. Se evaluó una sola vez, al finalizar la fase.

2.5.5.4 Porcentaje de contaminación bacteriana

Se evaluó la presencia de masas bacterianas en forma de pliegues, halos o rosetas, mediante observación sistémica. Se cuantificaron las unidades experimentales con colonias alrededor de los explantes o en el medio de cultivo, en relación porcentual de las mismas frente a la

población total de cada tratamiento. Se evaluó cada 15 días hasta el final de la fase, durante 4 semanas.

2.5.5.5 Porcentaje de contaminación fúngica

El porcentaje de contaminación fúngica se obtuvo mediante observación sistémica al cuantificarse las unidades experimentales con colonias aisladas o alrededor de los explantes, en relación con la población total para cada tratamiento por 100. Se evaluó cada 15 días hasta el final de la fase, durante 4 semanas.

2.5.5.6 Porcentaje de fenolización

El porcentaje de fenolización se obtuvo mediante observación sistémica hasta el final de la fase. Se contó la cantidad de unidades experimentales con oscurecimiento de los tejidos como signo de la presencia de oxidación fenólica, en relación con la población total para cada tratamiento por 100. Se evaluó cada 15 días.

2.5.5.7 Índice de multiplicación

Fue calculado como el promedio de yemas por explante, para cada tratamiento. Se evaluó al finalizar la fase.

Capítulo 3

3 Resultados y discusión

3.1 Tratamientos pregerminativos

En esta fase, se evaluaron tres tratamientos aplicados sobre semillas de *Solanum betaceum*, basados en el uso de imbibición en agua destilada estéril, agua oxigenada de 10 volúmenes, y escarificación (Tabla 1); valorando las variables días a la germinación, porcentaje de germinación, número de hojas, color de hojas, porcentaje de contaminación bacteriana, porcentaje de contaminación fúngica y porcentaje de fenolización.

Tabla 4.

Medianas para las variables días a la germinación, porcentaje de germinación, número de hojas, color de hojas y porcentaje de contaminación bacteriana en semillas de *Solanum betaceum*, para los tratamientos pregerminativos.

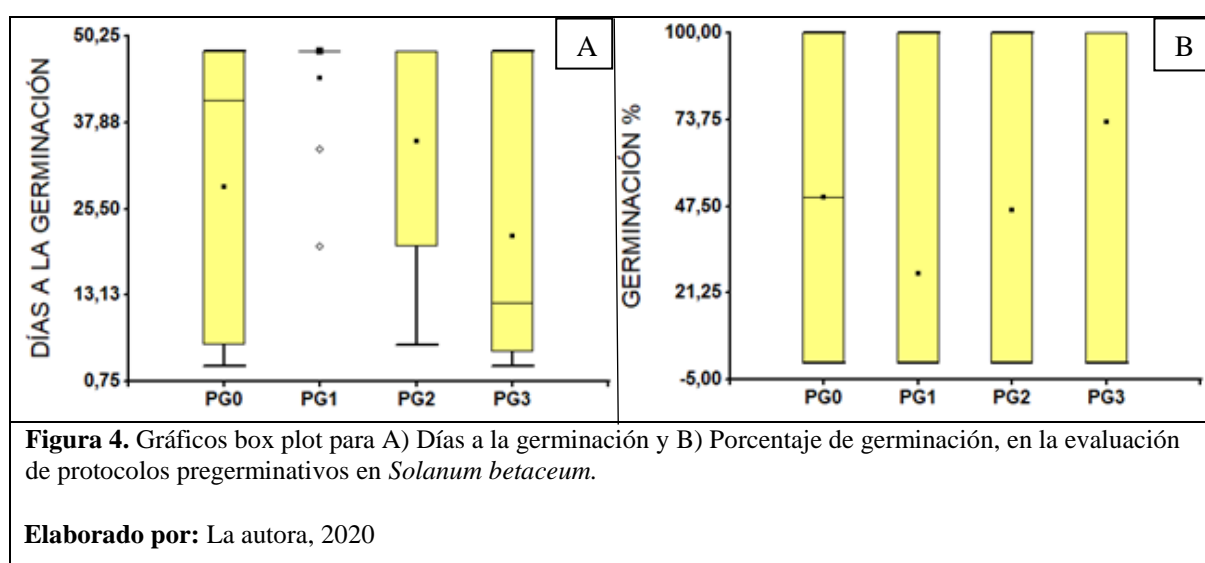
TRATAMIENTO	DÍAS A LA GERMINACIÓN	GERMINACIÓN (%)	Nº HOJAS	COLOR HOJAS	CONTAMINACIÓN BACTERIANA (%)
PG0	41ab	50ab	0ab	0ab	0a
PG1	48c	0a	0a	0a	0b
PG2	48bc	0ab	0ab	0ab	0a
PG3	12a	100b	2b	4,5b	0a

PG0: testigo. PG1: agua oxigenada 10 vol. por 5 min, imbibición de 48 h en agua destilada estéril, lavado de lixiviado a las 24 h. PG2: escarificación e imbibición en agua destilada estéril 24 h. PG3: imbibición 24 h en agua destilada estéril. Letras diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (Prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples $p \leq 0,05$).

Elaborado por: La autora, 2020

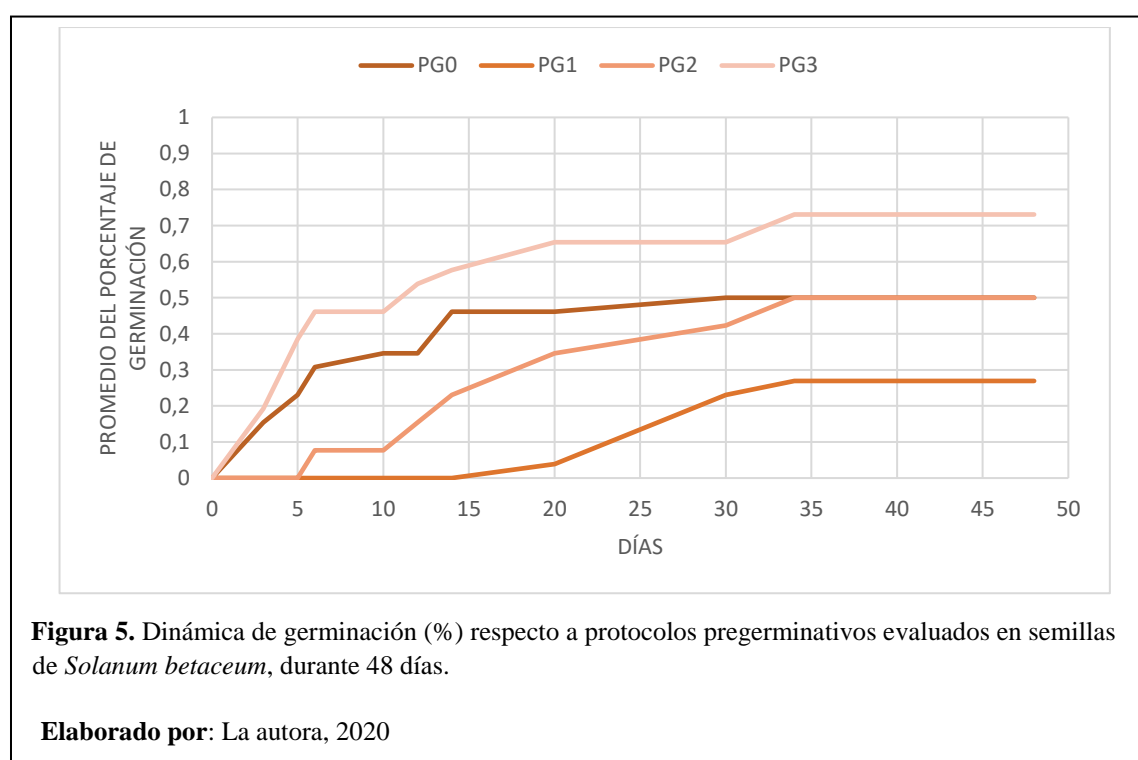
Se determinó que para las variables días de germinación, porcentaje de germinación, número de hojas, color de hojas y porcentaje de contaminación bacteriana, existió diferencia significativa (Prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples $p \leq 0,05$); por el contrario, la variable porcentaje de contaminación fúngica y el porcentaje de fenolización presentaron una mediana de 0 % por lo que resultaron no tener diferencia significativa (Prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples $p > 0,05$) (Tabla 4, Anexo 1).

3.1.1. Germinación



Para los días de germinación se detectaron 3 rangos de significancia y para el porcentaje de germinación 2 rangos (Tabla 4), el tratamiento pregerminativo PG3 mostró el menor número de días para la germinación con una mediana de 12 días, además conforme la Figura 4a se observa que la mitad de la población germinó entre los 3 y 12 días, y su mediana alcanzó el 100 % de germinación (Tabla 4, Figura 4B), es decir que este tratamiento fue precoz en comparación a los demás, se atribuye esta respuesta al tiempo de hidratación durante 24 horas; lo que concuerda con varios autores que reportan un incremento en la germinación gracias a tratamientos pregerminativos que involucraron hidratación de las semillas (Fallah, Malekzadeh, & Pessarakli, 2018; Górník & Lahuta, 2017; Noorhosseini, Jokar, & Damalas, 2018). Lutts *et al.* (2016), señalan que durante la imbibición de la semilla, la actividad

meristemática es limitada; sin embargo, ya se produce preparación para la división celular. De esta manera, la imbibición activa procesos metabólicos como la hidrólisis, la activación de enzimas y la ruptura de la latencia en la semilla; lo antes mencionado, favorece la expansión del embrión y una disminución significativa en el tiempo de emergencia de la radícula (Ogbuehi, Madukwe, & Ashilonu, 2013). El presente estudio presenta mayor precocidad en comparación con los resultados de Murillo-Gómez, Hoyos, & Chavarriaga (2017), quienes reportan el inicio de la germinación a los 15 días aproximadamente, en dicho estudio germinaron 57,5 % de las semillas de *Solanum betaceum*; estas fueron escarificadas y sembradas en medio MS con 3 ppm de BAP. Bewley, Bradford, Hilhorst, & Nonogaki (2013), afirman que esta mejora inducida respecto a la germinación, se basa en el efecto de la hidratación sobre la activación de los mecanismos de reparación del ADN, la sincronización del ciclo celular en G2 y la preparación para la división celular.



Desde la segunda semana PG3 ya mostró un mayor porcentaje de germinación promedio en contraste con los demás protocolos (Figura 5); seguido por el tratamiento testigo (PG0) que empezó con una respuesta elevada, sin embargo, a partir de los 33 días, no existió diferencia entre este y PG2; aunque se esperaba que la escarificación optimizara la respuesta germinativa al facilitar la absorción de agua, PG2 no presentó una mejor respuesta. Coincidiendo con autores que afirman que la escarificación puede provocar daños en el embrión, plántulas anormales y semillas muertas (Chaodumrikul, Kaewsorn, Chulaka, & Chanprasert, 2016). Además, en la mayoría de las especies estudiadas la escarificación no es el tratamiento que consigue 100 % de germinación; necesitándose otros procedimientos pregerminativos, o la combinación con otros factores que rompan la dormancia, como la iluminación, la refrigeración, el shock térmico, entre otros (Bradbeer, 2013).

El tratamiento PG1 presentó el porcentaje de germinación más bajo (Figura 5), esta característica podría atribuirse al tiempo de imbibición, que fue mayor en comparación a los demás tratamientos; Trigiano & Gray (2016), señalan que un exceso de la cantidad de agua disponible en la imbibición puede afectar negativamente la velocidad de la eliminación de la dormancia en semillas germinadas *in vitro*; coincidiendo con Trimble (2007), quien indica que la imbibición de la semilla inicia la germinación, en la que el agua y el oxígeno son necesarios para mantener el proceso en ruedo, pero un exceso de agua alrededor de la semilla, puede causar un suministro de oxígeno insuficiente para las células que estaban creciendo y dividiéndose rápidamente, lo cual detendría el proceso germinativo.

3.1.2 Número y color de hojas

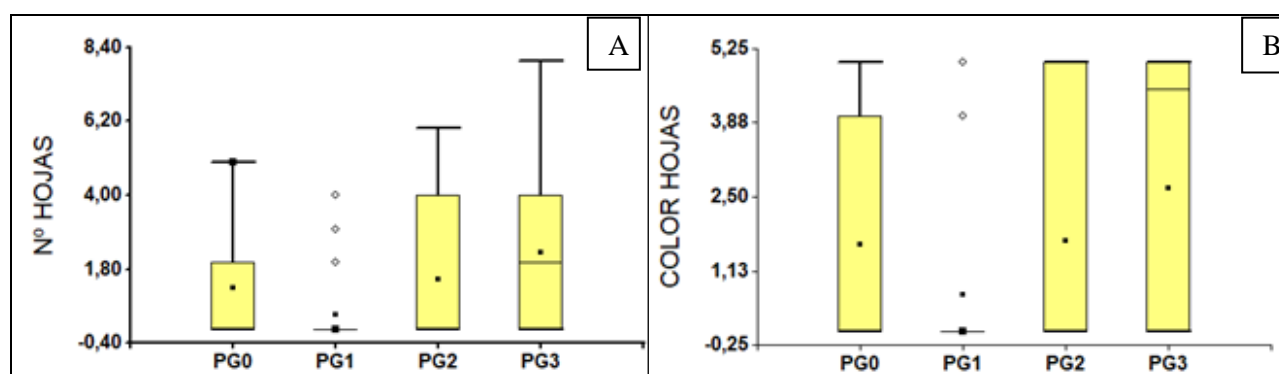
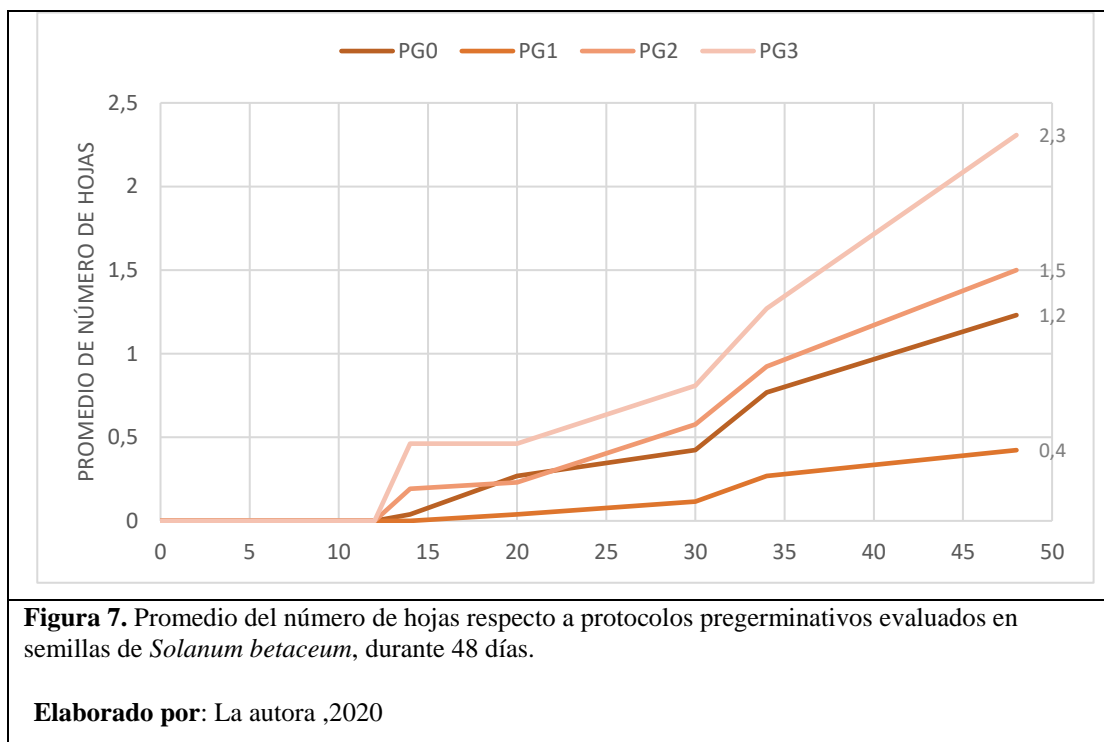


Figura 6. Gráficos box plot para las variables A) número de hojas y B) color de hojas, durante la evaluación de protocolos pregerminativos en *Solanum betaceum*.

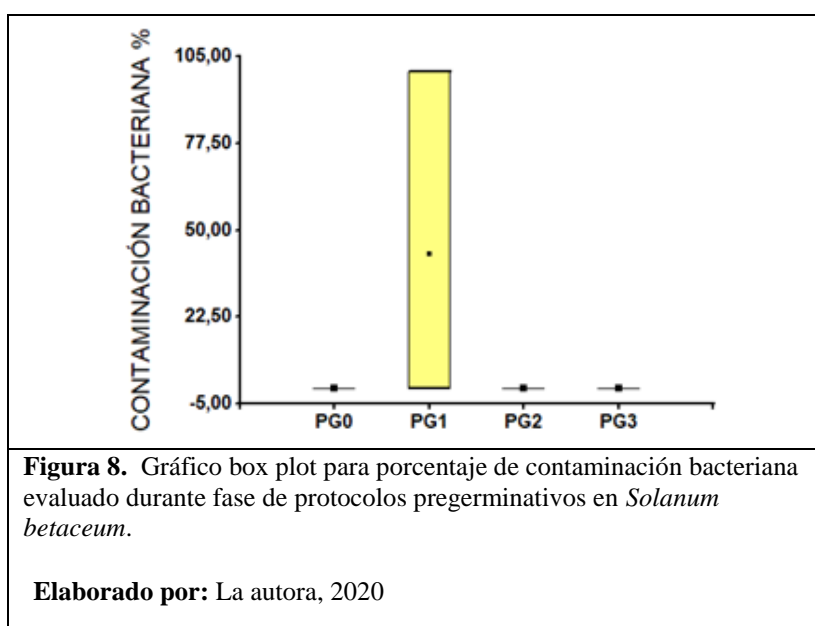
Elaborado por: La autora, 2020

Para el número y color de las hojas se detectaron 2 rangos de significancia (Tabla 4), el tratamiento pregerminativo PG3 mostró el mayor número de hojas, con una mediana de 2 hojas por explante (Figura 6A), y el mejor color, con una mediana de 4,5 en la escala de color (Figura 6B), lo que significa que las hojas presentaron un color verde oscuro (Figura 3). Los demás tratamientos, presentaron una mediana igual a 0 para ambas variables. El mayor promedio de número de hojas (2,3) presentados en el tratamiento PG3 (Figura 7), se puede atribuir, a la ventaja en el tiempo que obtuvo este tratamiento, debido a la precocidad en la germinación (Figura 5), lo que favoreció a los mecanismos metabólicos y morfogenéticos de las vitroplantas. El proceso de germinación precoz ha sido considerado una característica a evitarse por algunos autores (Hugo Cota-Sánchez, 2018; Welbaum, 1999); sin embargo otras investigaciones señalan que las plantas producidas por germinación precoz inducida no se vieron afectadas morfológicamente y el tiempo de germinación se redujo favorablemente (Cook, Adams, Hedley, Ambrose, & Wang, 1988; Flores & Sgrignoli, 1991).



Un color verde oscuro (4,5) en el limbo de las hojas (Tabla 4), es considerado un signo de sanidad en plantas de *Solanum betaceum*. El color de las hojas de una planta es un indicador de salud y vigor, verde más profundo indica una concentración más alta de clorofila, permitiendo una mayor eficiencia en la transformación de la energía solar en glucosa (Zhang *et al.*, 2017). Casierra-Posada, Peña-Olmos, & Ulrichs (2011), también concluyen que concurre una gran relación entre la coloración y el índice de clorofila. Un color verde de baja intensidad en la lámina de las hojas, debido a un contenido insuficiente de clorofila, puede ser signo de estrés o senescencia en las plantas (Shankar, Gupta, & Singh, 2019). Además, el color de la hoja es uno de los parámetros más importantes para los productores del fruto, desempeña un papel crucial en la elección, preferencia y aceptabilidad de las plantas (Sarker & Oba, 2018).

3.1.3 Contaminación bacteriana



Para la variable contaminación bacteriana se detectaron 2 rangos de significancia (Tabla 4), el único tratamiento que presentó 100 % de contaminación bacteriana fue el tratamiento PG1 (Figura 8), esta característica podría deberse a una fuente microbiana exógena que entraría en contacto con las semillas al realizarse el cambio de agua destilada a las 24 horas (proceso que no se realizó en el resto de tratamientos); Farooq, Wahid, & Siddique (2012), consideran al proceso de imbibición con lavado de lixiviado como una posible fuente de contaminación. Asimismo Ma (2019), indica que el almacenar semillas que conservan su cubierta, bajo hidratación, mantiene generalmente una alta viabilidad microbiana.

3.2 Fase de introducción

En esta fase, se evaluó dos explantes (yema y semilla), para las variables porcentaje de respuesta, número de hojas, color de hojas, porcentaje de callogénesis, porcentaje de contaminación bacteriana, porcentaje de contaminación fúngica y porcentaje de fenolización (Tabla 5). Se realizó un análisis estadístico de los datos recopilados a los 19 días de introducción al medio.

Tabla 5.

Medianas para las variables porcentaje de respuesta, número de hojas, color de hojas, porcentaje de callogénesis, porcentaje de contaminación bacteriana, porcentaje de contaminación fúngica y porcentaje de fenolización para los explantes de *Solanum betaceum*.

		RESPUESTA (%)	Nº HOJAS	COLOR HOJAS	CALLOGÉNESIS (%)	CONTAMINACIÓN BACTERIANA (%)	CONTAMINACIÓN FÚNGICA (%)	FENOLIZACIÓN (%)
TRATAMIENTO	S	50a	0a	0a	0a	0a	0	0
	Y	100b	3b	5b	100b	100b	0	0

Elaborado por: La autora, 2020

Se determinó que en cuanto a las variables porcentaje de respuesta, número de hojas, color de hojas, porcentaje de callogénesis y porcentaje de contaminación bacteriana, existió diferencia significativa (Prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples $p \leq 0,05$); las variables porcentaje de contaminación fúngica y porcentaje de fenolización no presentaron diferencias (Tabla 5, Anexo 2).

3.2.1 Respuesta morfogénica

Para las primeras cuatro variables, relacionadas a la respuesta morfogénica se detectaron 2 rangos de significancia (Tabla 5), se encontró que el explante yema mostró mayores resultados para las variables porcentaje de respuesta con una mediana de 100 % (Figuras 9A y 9B), número de hojas con una mediana igual a 3 (Figura 9C), color de hojas con una mediana de 5 que indica una coloración verde oscuro (Figuras 3 y 9D) y 100 % de callogénesis (Figura 9E). Mientras que, la semilla presenta un porcentaje de repuesta de 50 % (Figura 10) y una mediana

de 0 para las demás variables (Tabla 5), lo que puede ser atribuido a que la latencia de las semillas complica y retrasa el proceso de germinación, siendo fisiológicamente más complejo en comparación al desarrollo de las yemas axilares. La latencia o dormancia puede darse por factores endógenos o exógenos; varias especies arbóreas y ornamentales propagadas por semillas se ven limitadas por los bajos porcentajes de germinación y su aparición tardía e irregular (Batista, Costa, Megguer, da Silva Lima, & de Fátima Sales, 2014). La latencia endógena está relacionada con procesos como la inmadurez embrionaria y el equilibrio entre promotores e inhibidores, responsables de restringir el intercambio de gases, afectan el pH, la respiración, la actividad enzimática y tienen efectos sobre la síntesis de proteínas; la latencia exógena es impuesta por la envoltura, que impide el intercambio de gases y la entrada de agua, así como por la presencia de inhibidores en la cubierta de las semillas (Baskin & Baskin, 1998).

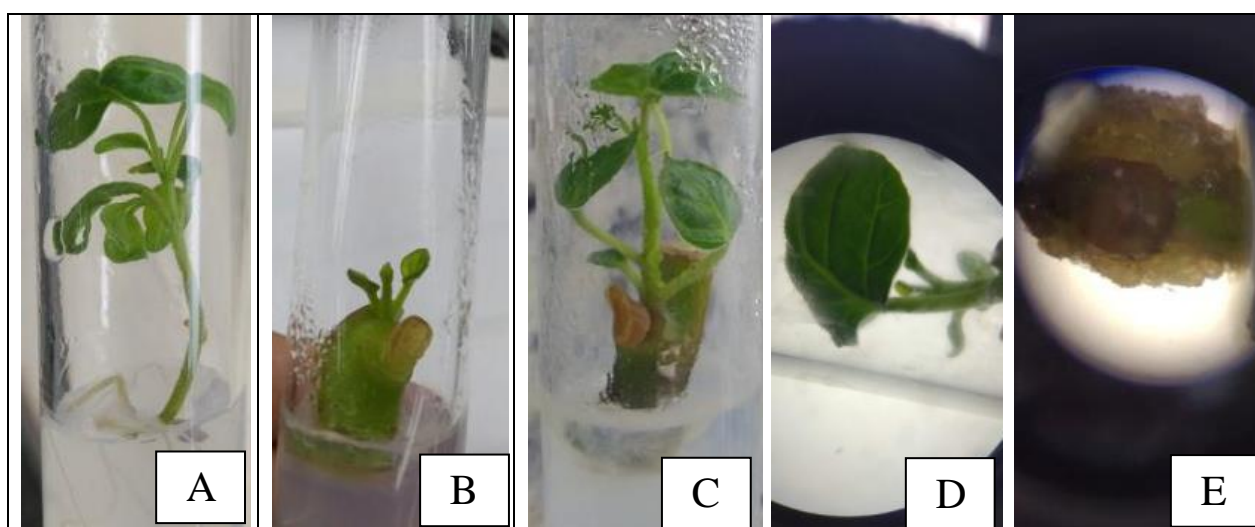
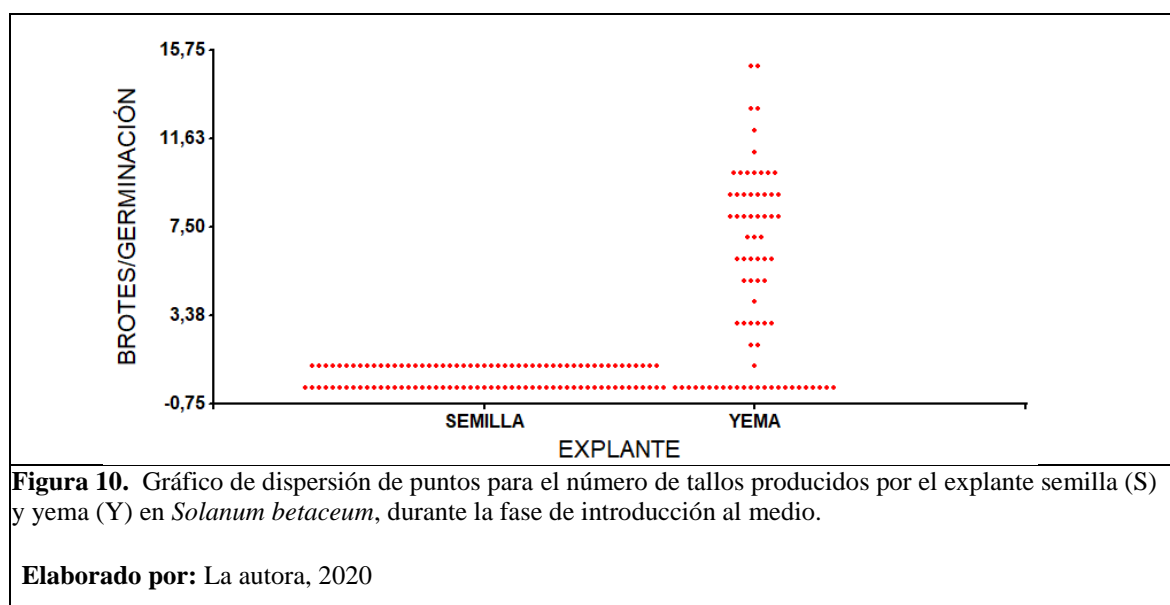


Figura 9. *Solanum betaceum* en fase de introducción. A) Respuesta en semillas, planta de 7 semanas. B) Respuesta en yemas a los 6 días después de la siembra. C) Respuesta en yemas y contaminación endógena a los 19 días después de la siembra. D) Hoja bajo microscopio estereoscópico con un aumento de 7,5 x. E) Tejido indiferenciado (callo) en tallo bajo microscopio estereoscópico con un aumento de 7,5 x.

Elaborado por: La autora, 2020

En cuanto al porcentaje de respuesta y el número de hojas (Tabla 5), se observa que las yemas presentaron el mayor porcentaje de respuesta con una mediana del 100 % y 3 hojas por explante. Isah (2020), afirma que debido a que las yemas axilares son de fácil disponibilidad y que

necesitan estímulos para desencadenar la ruptura de su dormancia, el explante de segmento nodal se encuentra entre los más utilizados en la inducción y proliferación de brotes en plantas leñosas. Ali & Mirza (2006), muestran resultados parecidos en su estudio aplicado a *Citrus jambhiri*; los explantes nodales obtuvieron un porcentaje de respuesta del 83 %, el más alto entre los 4 explantes puestos a prueba, mientras que los cotiledones mostraron el peor resultado con tan solo 16 %.

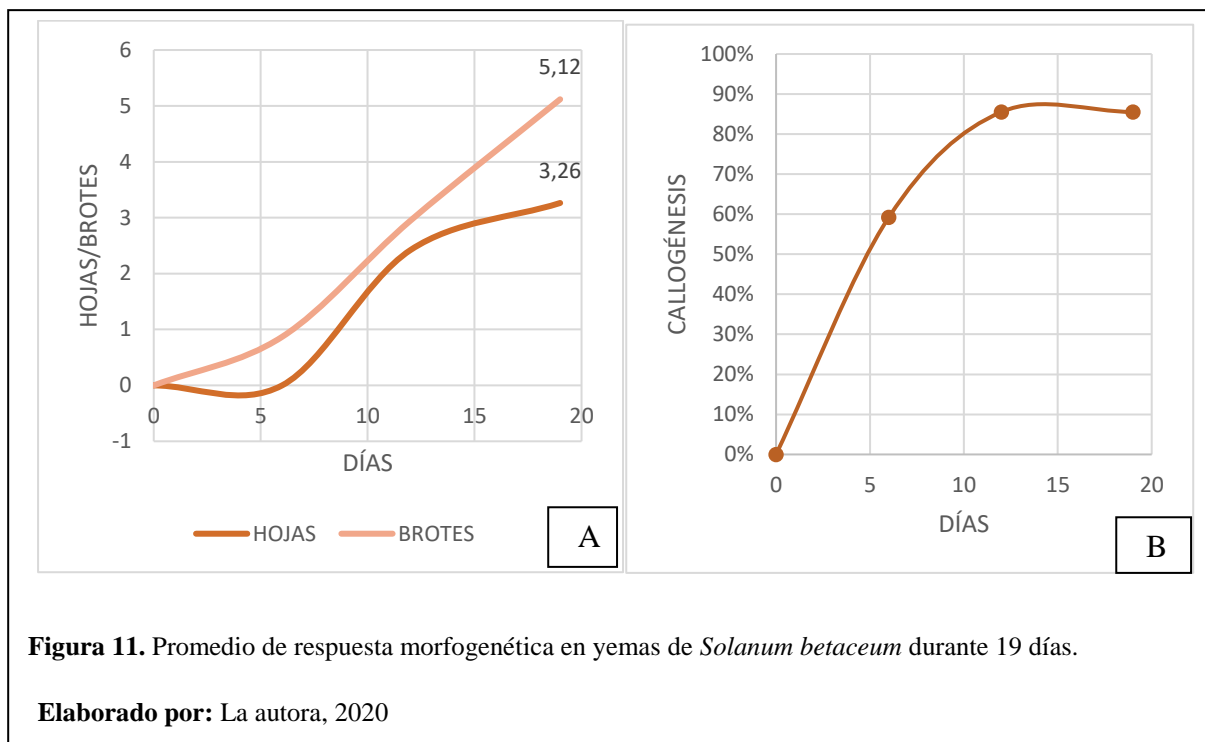


En la figura 10 se observa la distribución de los datos de ambos explantes, siendo la semilla la que presenta bajo porcentaje de respuesta, con un 50 % de germinación, generando un solo tallo por explante de semilla; mientras que, las yemas mostraron una dispersión mucho más amplia, lo que demuestra una mayor producción de tallos (1 a 15 tallos por explante de yema), por ende una mayor producción de brotes.

Es evidente que el explante yema presentó las mejores respuestas morfogénéticas, se observó que la formación de brotes inició al sexto día, y el aparecimiento de las hojas unos días después, hasta que alcanzaron las características necesarias para ser cuantificables. A partir del sexto día, el número de brotes varió desde 0,86 hasta 5,12; mientras que a partir del doceavo día, el

número de hojas producidas incrementó desde 2,95 hasta llegar a 3,26 en el día 19 (Tabla 5, Figuras 10 y 11).

Entre las respuestas morfogenéticas encontradas en el explante yema está la callogénesis (Figura 9E), el incremento en la formación de callo se mantuvo estable a través del tiempo, durante las primeras 2 semanas (Figura 11). La diferencia entre el porcentaje de callogénesis entre ambos explantes es notorio; con el explante yema se obtuvo una mediana del 100 % contra 0 % para las semillas (Tabla 5). Al tratarse de yemas existe una alta probabilidad de formación de tejido no diferenciado estimulado por los cortes producidos antes de introducirse al medio de cultivo (Bhatia, Sharma, Dahiya, & Bera, 2015). El estudio sobre la formación de callos conducido por Ikeuchi *et al.* (2017), revela como las heridas en los tejidos vegetales incitan cambios transcripcionales eficientes, comenzando por respuestas vertiginosas al estrés, continuas a la aceleración de procesos metabólicos y de síntesis proteica, y la ulterior activación de los mecanismos del ciclo celular; además sus análisis de ontología génica descubrieron que las heridas alteran la expresión de la biosíntesis de reguladores de crecimiento y genes de respuesta. La formación de callo se atribuye a las heridas, ya que se produce una acumulación de citoquinina antes de la formación de callos (Ikeuchi *et al.*, 2017; Ling, Liew, Lim, Subramaniam, & Chew, 2018), lo que favorece a la división celular.



La inducción de callos sin reguladores de crecimiento en el medio, partiendo de semilla, no es un proceso común; por el contrario, se usan principalmente auxinas para este fin (Dharmayanti, Sulistyaningsih, & Wulandari, 2018). El medio utilizado estuvo libre de reguladores de crecimiento, coincidiendo con el estudio previo de Copatti *et al.* (2016), quienes mencionan que la formación de callos en la base de los explantes de segmentos nodales con yemas de *Solanum betaceum* se produjo independientemente de la dosis de los reguladores utilizados.

3.2.2 Contaminación bacteriana

Para la variable contaminación bacteriana se detectaron 2 rangos de significancia, el explante yema fue notoriamente alto, con una mediana de 100 %, en comparación con semilla, que no presentó contaminación (0 %) (Tabla 5). Esto se debe a una fuente endógena, debido a que el crecimiento de las colonias observado provenía del explante y solo se evidenció en las zonas en contacto con el medio de cultivo (Figura 9C). Las plantas madres fueron propagadas a partir de semillas, es probable que hayan portado una bacteria endófito, cuyas colonias se manifestaron únicamente con los cortes y en contacto con el medio, como lo indica Brader *et*

al. (2017), los microorganismos endófitos (bacterias u hongos) son una clase de simbioses de plantas que viven dentro de los tejidos de estas sin inducir ningún síntoma de enfermedad, y que están asociados con la planta a lo largo de su historia de vida, desde la germinación de la semilla hasta el desarrollo de los frutos.

3.3 Fase de multiplicación

Para la fase de multiplicación, se tomaron plantas producidas en la fase previa y se sembraron segmentos nodales, se evaluó el estado físico del medio de cultivo y la adición de diferentes concentraciones de ANA (Tabla 6).

Tabla 6.

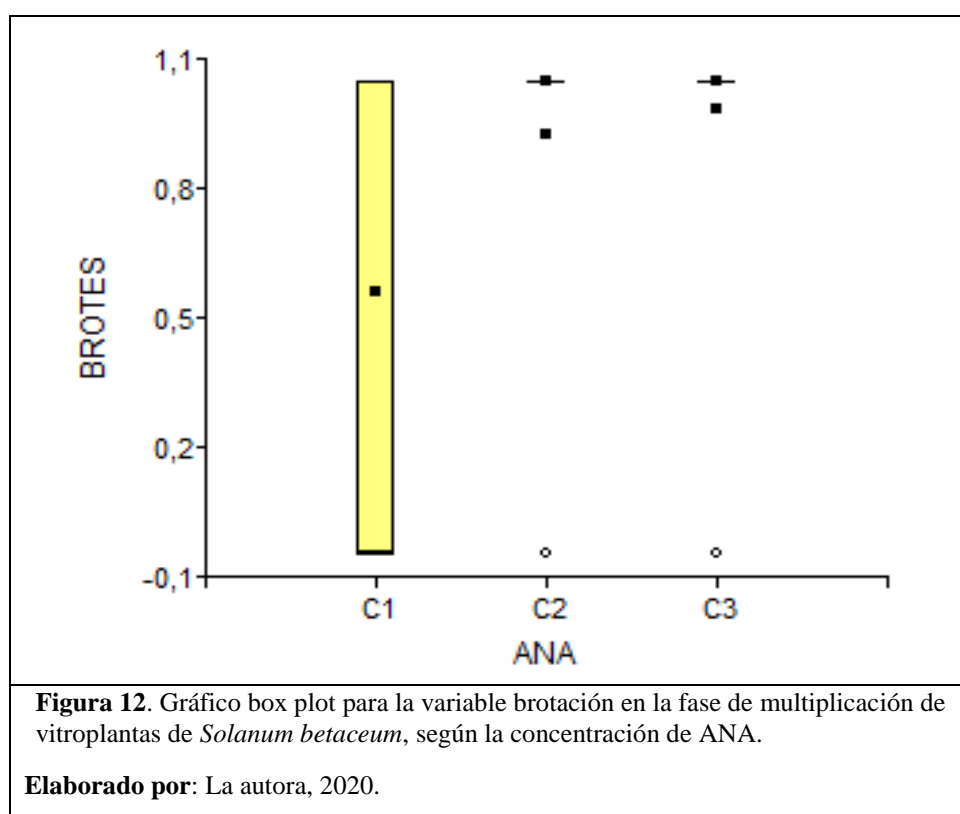
Medianas para las variables porcentaje de brotación, número de hojas y color de hojas, en vitroplantas de *Solanum betaceum*.

FACTORES	TRATAMIENTOS	BROTACIÓN (%)	Nº HOJAS	COLOR HOJAS
ESTADO FÍSICO MEDIO (M)	M1 SEMISÓLIDO	100	1b	5b
	M2 BICÁPICO	100	0a	0a
CONCENTRACIÓN ANA	C1 (0 ppm)	100a	0,5	2
	C2 (0,5 ppm)	100ab	1	3,5
	C3 (1 ppm)	100b	0	0
M x C	M1C1	100	1bc	4bcd
	M1C2	100	2c	4cd
	M1C3	100	1bc	5d
	M2C1	100	0abc	0abc
	M2C2	100	0ab	0ab
	M2C3	100	0a	0a

Elaborado por: La autora, 2020

3.3.1 Porcentaje de brotación

Para la variable porcentaje de brotación, se encontró diferencia significativa para la concentración de ANA (Prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples $p \leq 0,05$); mas no hubo diferencia al analizarse el estado físico del medio de cultivo, ni la interacción de ambos factores (Prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples $p > 0,05$) (Tabla 6, Anexo 3).



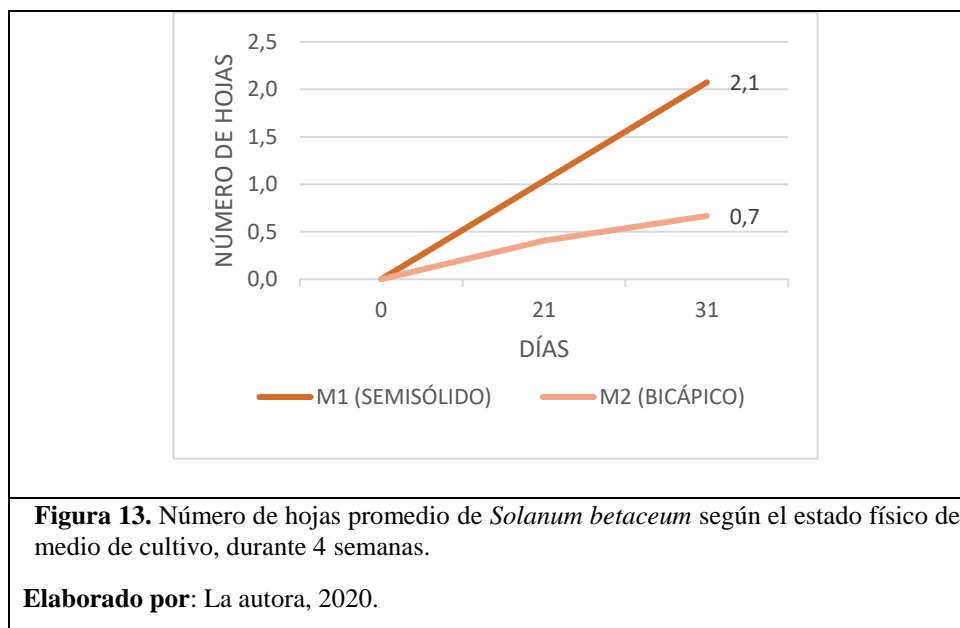
Para brotación en relación al regulador de crecimiento ANA, se detectaron 2 rangos de significancia, como mejor tratamiento se ubicaron C2 y C3, con 0 y 0,5 ppm respectivamente, ambos con una mediana de 100 % de brotación (Tabla 6, Figura 12), esto se debe a que concentraciones bajas de auxinas sin combinarse con otros reguladores de crecimiento resultan en un aumento en el porcentaje de brotación; lo cual coincide con las investigaciones en orquídeas del género *Dendrobium*, los autores señalan a 0,05 ppm como la concentración que

obtuvo el mayor índice de multiplicación (Sakina et al., 2019; Siron, Noertjahyani, Taryana, & Romiyadi, 2019).

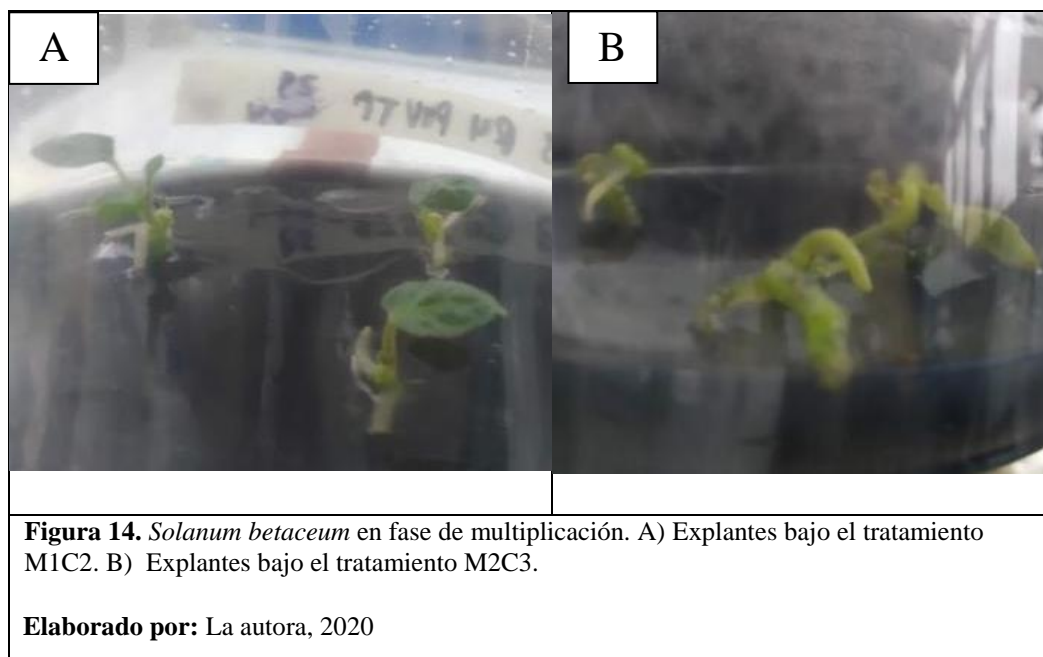
3.3.2 Número y Color de hojas

En cuanto a las variables número y color de hojas existió diferencia significativa para el estado físico del medio de cultivo, y la interacción de ambos factores (Prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples $p \leq 0,05$); por el contrario, al tomar en cuenta la concentración de ANA, no se encontró diferencia significativa (Prueba de Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples $p > 0,05$) (Tabla 6, Anexo 3).

El estado físico del medio de cultivo influyó en el número de hojas, ya que el medio semisólido presentó la mayor mediana con 1 hoja por explante y con un color verde oscuro (mediana igual a 5) (Tabla 6, Figuras 13 y 14A); mientras que el medio bicápico presentó una mediana de 0, tanto para número de hojas como para color, asimismo se evidenció que el medio bicápico no formó hojas normales; sus hojas presentaron hiperhidratación, de tal manera que no favorece en la fase de multiplicación (Figura 14B). Los resultados concuerdan con Puga (2019), quien sometió a condiciones de inmersión permanente (medio líquido) a explantes de limbo, sin éxito con respecto a la formación de brotes de calidad; se produjo la formación de estructuras nudosas y compactas con morfología irregular. La inmersión permanente de los explantes puede conducir a la anoxia de los cultivos debido a la excesiva humedad relativa. Además, el estudio realizado por Jain & Yadav (2016), demuestra que la concentración y el tipo de agente gelificante usado en el cultivo *in vitro* puede hacer la diferencia entre la producción de brotes de excelente calidad o brotes vitrificados.

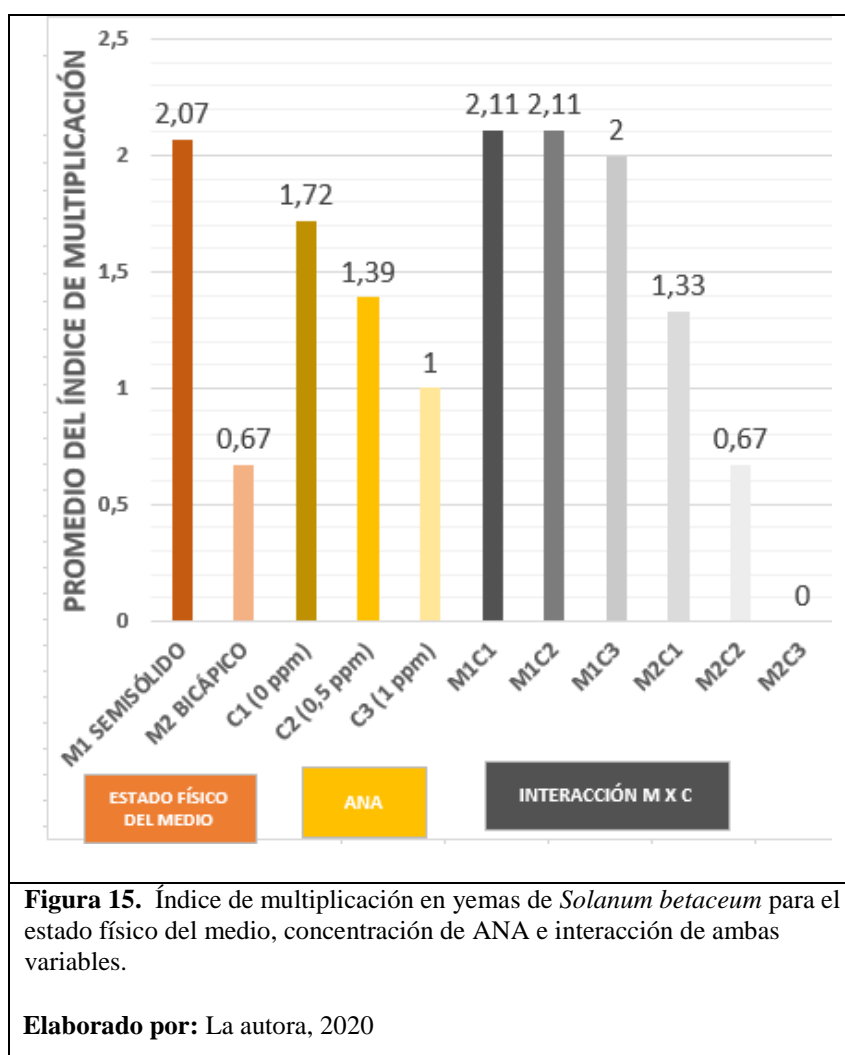


El promedio del número de hojas se vió influenciado por el estado físico del medio de cultivo; a los 31 días, en el medio semisólido se obtuvo un promedio de 2,1 hojas, mientras que en el medio bicápico llegó a 0,7 hojas en dicho periodo (Figura 13). En el sistema semisólido, el intercambio gaseoso y el suministro de oxígeno son bastante similares en comparación a los sistemas de inmersión temporal (Zhao, Sun, Wang, Saxena, & Liu, 2012). Kunakhonnuruk, Inthima, & Kongbangkerd (2019), estudiaron 3 estados físicos del medio de cultivo, sus resultados se asemejan a la presente investigación; no existió diferencia entre el índice de multiplicación del sistema semisólido contra el sistema de inmersión continua, en cambio el sistema de inmersión temporal fue capaz de obtener el mayor índice entre los 3 sistemas. También Gao, Xu, Zhang, Cheng, & Yang (2020), indican que el uso de bajas concentraciones de agar, aumentan significativamente la tasa de vitrificación de *Dendrobium officinale*; y una alta concentración de 9 g/L de agente gelificante mejoró la regeneración de las plántulas de arroz (Krishna Repalli, Kumar Geda, N Pradhan, & N Rao, 2019).



Las mejores interacciones, entre el estado físico del medio y la concentración de ANA, fueron M1C1, M1C2 y M1C3; M1C2 produjo 2 hojas, siendo la mayor mediana para número de hojas; seguido por M1C1 y M1C3 con 1 hoja. M1C3, obtuvo la mejor mediana para color de hojas, con un valor de 5 (color verde oscuro), seguido por M1C1 y M1C2 con un valor de 4 (color verde oliva) (Figura 3). Estos resultados sugieren que el medio semisólido junto con ANA, producen una mayor proliferación celular, proveyéndole un soporte físico que indican que esta es la interacción óptima para usarse en la fase de multiplicación de *Solanum betaceum*. Los resultados coinciden con el estudio realizado por AlKhateeb & Alturki (2014), los autores mencionan que el medio semisólido brinda un buen soporte e intercambio gaseoso para la multiplicación de explantes *in vitro*; asimismo, Trong et al. (2017), señalan que las auxinas promueven la división celular y la expansión celular en los cultivos de tejidos vegetales.

3.3.3 Índice de multiplicación (IM)



El medio semisólido brindó un buen soporte para el desarrollo del explante al producirse 2,07 yemas por explante, es decir, 1,4 yemas más que el medio líquido. La concentración más baja de ANA (0 ppm), demostró resultados más exitosos que las concentraciones más altas, con un índice de multiplicación de 1,72. Las interacciones M1C1 y M1C2, exhibieron el mayor índice de multiplicación, con 2,1 yemas por explante (Figura 15). Kunakhonnuruk, Inthima, & Kongbangkerd (2019), analizaron la influencia de 3 estados físicos del medio de cultivo sobre el desarrollo *in vitro* de *Epipactis flava*; el sistema de inmersión temporal obtuvo un 53,3 % de plantas de calidad y $4,4 \pm 0,1$ hojas por brote, por el contrario, el sistema de inmersión continua fue el menos exitoso con un 5,5 % de plantas de calidad y $2,7 \pm 0,5$ hojas por brote. El análisis de la interacción entre el medio semisólido y ANA nos permite deducir que el estado

del medio, además favorece la adecuada absorción de reguladores de crecimiento colocados en este. Esto se debe al soporte que brinda este estado físico para la liberación controlada del regulador (Meneses, 2001).

Los resultados sugieren que el medio bicápico generó explantes de baja calidad, lo cual puede deberse la exposición continua al medio líquido. Además, corresponde resaltar que los explantes bajo la interacción del medio bicápico con 1 ppm de ANA (M2C3) presentan vitrificación, a pesar de que no existe diferencia entre el porcentaje de brotación; se evidencia en el índice de multiplicación que el promedio de yemas viables fue 0 (el menor entre todos los tratamientos) (Figuras 14B y 15).

Conclusiones

El mejor tratamiento pregerminativo fue PG3 (imbibición por 24 horas), aplicado sobre semillas de *Solanum betaceum*, presentando los mejores valores para la germinación, con una mediana de 12 días a la germinación y 100 % de semillas germinadas.

El explante yema obtuvo los mejores resultados para las variables porcentaje de respuesta con una mediana de 100 %, 3 hojas por explante, color de hojas verde oscuro (con una mediana de 5) y 100 % de callogénesis.

El medio semisólido brindó un buen soporte para el desarrollo del explante, ya que presentó el mayor número de hojas y color verde oscuro, además al producir 2,07 yemas por explante.

Las mejores interacciones, fueron M1C1, M1C2 y M1C3. La interacción M1C2 produjo 2 hojas, siendo la mayor mediana para número de hojas; y, M1C3, obtuvo la mejor mediana para color de hojas, con un valor de 5 (color verde oscuro). Además, las interacciones M1C1 y M1C2 se determinaron como los medios de cultivo óptimos para la fase de multiplicación, exhibiendo el mayor índice de multiplicación, de 2,1 yemas viables por explante.

Recomendaciones

Utilizar un medio de cultivo cuyo estado físico sea semisólido, para evitar problemas de vitrificación, durante la multiplicación *in vitro* de *Solanum betaceum*.

Realizar análisis previo, para determinar la presencia de patógenos endófitos en los explantes de partida, y adicionar un protocolo de desinfección que incluya agentes antibióticos de acción sistémica.

Bibliografía

- Abril-Saltos, R., Ruiz-Vásquez, T., Alonso-Lazo, J., & Cabrera-Murillo, G. (2017). Germinación, diámetro de semilla y tratamientos pregerminativos en especies con diferentes finalidades de uso. *Agronomía Mesoamericana*, 28(3), 703–717. <https://doi.org/10.15517/ma.v28i3.26205>
- Acosta-Quezada, P. G., Riofrío-Cuenca, T., Rojas, J., Vilanova, S., Plazas, M., & Prohens, J. (2016). Phenological growth stages of tree tomato (*Solanum betaceum* Cav.), an emerging fruit crop, according to the basic and extended BBCH scales. *Scientia Horticulturae*, 199, 216–223. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.12.045>
- Al Zoubi, O. M. (2020). Effect of mechanical and chemical scarifications of date palm seeds (*Phoenix dactylifera* L.) on *in vitro* germination. In *Bulgarian Journal of Agricultural Science* (Vol. 26).
- Albany, N. R., Vilchez, J. A., León, S., Nava, A. R., Martínez, L. J., & Molina, M. A. (2015). Medios de cultivo líquidos: un avance para la micropropagación comercial de zábila (*Aloe barbadensis* Mill.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(1), 24–31. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v17n1.50669>
- Ali, S., & Mirza, B. (2006). Micropropagation of rough lemon (*Citrus jambhiri* Lush.): Effect of explant type and hormone concentration. *Acta Botanica Croatica*, 65(2), 137–146.
- AlKhateeb, A. A., & Alturki, S. M. (2014). A comparison of liquid and semi-solid cultures on shoot multiplication and rooting of three date palm cultivars (*Phoenix dactylifera* L.) *in vitro*. *Advances in Environmental Biology*, 8(16), 263–269.
- Alves, A., Caeiro, A., Correia, S. I., Veríssimo, P., & Canhoto, J. (2017). Establishment and biochemical characterization of tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) embryogenic cell suspension cultures. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 53(6), 606–618.

<https://doi.org/10.1007/s11627-017-9864-z>

Animal and Plant Health Inspection Service USDA. (2018). Importation of Tree Tomatoes From Ecuador Into the Continental United States. Retrieved March 18, 2020, from Federal Register website: <https://www.federalregister.gov/documents/2018/06/04/2018-11890/importation-of-tree-tomatoes-from-ecuador-into-the-continental-united-states>

Arroyo, W. F. V., Correa, A. V. S., Sandoval, M. V. T., Castillo, W. A. V., Martínez, A., Díaz, P. F. V., & Ron, L. (2016). Estimación de parámetros de calidad del fruto para segregantes interespecíficos de tomate de árbol (*Solanum betaceum* Cav.) en respuesta de resistencia a la Antracnosis (*Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds). *Acta Agronomica*, 65(3), 304–311. <https://doi.org/10.15446/acag.v65n3.49771>

Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (1998). Seeds. Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. *Annals of Botany*, 86(3), 705–707. <https://doi.org/10.1006/anbo.2000.1238>

Batista, P. F., Costa, A. C., Megguer, C. A., da Silva Lima, J., & de Fátima Sales, J. (2014). Overcoming dormancy and characterization of germination in Cerrado “algodãozinho” seeds treated with dimethyl sulphoxide. *South African Journal of Botany*, 92, 89–93. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.02.004>

Bello, O. A., Esan, E. B., & Obembe, O. O. (2018). Establishing surface sterilization protocol for nodal culture of *Solanecio biafrae*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 210(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/210/1/012007>

Bewley, J. D., Bradford, K. J., Hilhorst, H. W. M., & Nonogaki, H. (2013). Seeds: Physiology of development, germination and dormancy, 3rd edition. In *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy, 3rd Edition* (Vol. 9781461446). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4693-4>

- Bhatia, S., Sharma, K., Dahiya, R., & Bera, T. (2015). Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences. In *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences* (1st ed., Vol. 1). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4/00004-2>
- Bradbeer, J. W. (2013). Seed Dormancy and Germination. In Springer Science & Business Media (Ed.), *Seed Dormancy and Germination* (First). https://doi.org/10.1007/978-94-011-6574-7_8
- Brader, G., Compant, S., Vescio, K., Mitter, B., Trognitz, F., Ma, L.-J., & Sessitsch, A. (2017). Ecology and Genomic Insights into Plant-Pathogenic and Plant-Nonpathogenic Endophytes. *Annual Review of Phytopathology*, 55(1), 61–83. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035641>
- Buono, S., Abdo, G., Hamity, V., Ansonaud, G., & Ferreyra, M. (2019). *El tomate árbol de las yungas. Cultivo, potencialidades e importancia.*
- Casanova-Sáez, R., & Voß, U. (2019, August 1). Auxin Metabolism Controls Developmental Decisions in Land Plants. *Trends in Plant Science*, Vol. 24, pp. 741–754. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.05.006>
- Casierra-Posada, F., Peña-Olmos, J., & Ulrichs, C. (2011). Crecimiento y eficiencia fotoquímica del fotosistema II en plantas de fresa (*Fragaria* sp.) Afectadas por la calidad de la luz: implicaciones agronómicas. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*. <https://doi.org/10.31910/rudca.v14.n2.2011.774>
- Castro-Vargas, H. I., Benelli, P., Ferreira, S. R. S., & Parada-Alfonso, F. (2013). Supercritical fluid extracts from tamarillo (*Solanum betaceum* Sendtn) epicarp and its application as protectors against lipid oxidation of cooked beef meat. *Journal of Supercritical Fluids*, 76, 17–23. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.10.006>

- Chandra, S., Lata, H., & Varma, A. (2012). Biotechnology for medicinal plants: Micropropagation and improvement. In *Biotechnology for Medicinal Plants: Micropropagation and Improvement* (Vol. 9783642299). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-29974-2>
- Chaodumrikul, S., Kaewsorn, P., Chulaka, P., & Chanprasert, W. (2016). Breaking seed dormancy in smooth loofah (*Luffa cylindrica* (L.) M. Roem.) using scarification and dry heat treatment. *Agriculture and Natural Resources*, 50(2), 85–88. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2015.09.003>
- Contreras, I., & Almeida, J. (2003). MICROPROPAGACIÓN DEL TOMATE DE ÁRBOL(*Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendtn.), SOLANACEAE SILVESTRE USADA EN LA ALIMENTACIÓN HUMANA. *Revista Forest*, 47(2), 9–13.
- Cook, S. K., Adams, H., Hedley, C. L., Ambrose, M. J., & Wang, T. L. (1988). An analysis of seed development in *Pisum sativum*. VII. Embryo development and precocious germination *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 14(2), 89–101. <https://doi.org/10.1007/BF00041182>
- Copatti, A., Loy, F., Cruz, J. G., & Schwartz, C. D. (2016). Reguladores vegetais na propagação *in vitro* de Tamarileiro (*Solanum betaceum*). *Revista Da 13ª Jornada de Pós Graduação e Pesquisa Congrega 2016*, 10.
- Correia, S., & Canhoto, J. (2012). Biotechnology of tamarillo (*Cyphomandra betacea*): From *in vitro* cloning to genetic transformation. *Scientia Horticulturae*, 148, 161–168. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.09.037>
- Criollo, H., Insuasti, K., & Delgado, W. (2016). *In vitro* regeneration of tamarillo [*Solanum betaceum* (Cav.) Sendt. *CIENCIAS HORTÍCOLAS*, 10(2), 252–261. <https://doi.org/10.17584/rcch.2016v10i2.5750>

- Das, S. K., Avasthe, R., & Ghosh, G. K. (2018). *Solanum betaceum* : An Underutilized but Potential Tree Species with Anticancer Activity . *Bio Science Research Bulletin*, 35(1), 36. <https://doi.org/10.5958/2320-3161.2019.00007.5>
- Dávila, M. G. (2016). *ESTUDIO DE FACTIBILIDAD PARA LA PRODUCCIÓN DE TOMATE DE ÁRBOL EN LA PROVINCIA DE IMBABURA Y SU COMERCIALIZACIÓN EN LOS MERCADOS DEL DISTRITO METROPOLITANO DE QUITO*. Universidad Central del Ecuador.
- Dharmayanti, K., Sulistyaningsih, E., & Wulandari, R. A. (2018). Callus Induction on True Shallot Seed Explant Using a Combination of BA and 2,4-D. *Ilmu Pertanian (Agricultural Science)*, 2(3), 137. <https://doi.org/10.22146/ipas.26276>
- Ehirim, B. O., Ishaq, M. N., Agboire, S., Solomon, C., Ejizu, A. N., & Diarra, A. (2014). Acclimatization: An Important Stage in Tissue Culture. *Asian American Plant Science Research Journal*, 1(April), 1–7. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.15272.47369>
- Elmongy, M. S., Cao, Y., Zhou, H., & Xia, Y. (2018). Root Development Enhanced by Using Indole-3-butyric Acid and Naphthalene Acetic Acid and Associated Biochemical Changes of *in vitro* Azalea Microshoots. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37(3), 813–825. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9776-5>
- Fallah, S., Malekzadeh, S., & Pessarakli, M. (2018). Seed priming improves seedling emergence and reduces oxidative stress in *Nigella sativa* under soil moisture stress. *Journal of Plant Nutrition*, 41(1), 29–40. <https://doi.org/10.1080/01904167.2017.1381719>
- Farooq, M., Wahid, A., & Siddique, K. H. M. (2012). Micronutrient application through seed treatments - a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 12(1), 125–142. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162012000100011>

- Feicán-Mejía, C. G., Encalada-Alvarado, C. R., & Becerril-Román, A. E. (2016). DESCRIPCIÓN AGRONÓMICA DEL CULTIVO DE TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum* Cav.). *Agroproductividad*, 9(8), 78–87. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/312938646_DESCRIPCION_AGRONOMICA_DEL_CULTIVO_DE_TOMATE_DE_ARBOL_Solanum_betaceum_Cav
- Flores, H. E., & Sgrignoli, P. J. (1991). *In vitro* culture and precocious germination of *Taxus* embryos. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 27(3), 139–142. <https://doi.org/10.1007/BF02632197>
- Gao, H., Xu, D., Zhang, H., Cheng, X., & Yang, Q. (2020). Effects of culture medium composition and PEG on hyperhydricity in *Dendrobium officinale*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 56(2), 143–149. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10075-y>
- González-López, Ó., & Casquero, P. A. (2014). Effects of GA3 Pregerminative Treatment on *Gentiana lutea* L. var. *aurantiaca* Germination and Seedlings Morphology. *The Scientific World Journal*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/751279>
- Górník, K., & Lahuta, L. B. (2017). Application of phytohormones during seed hydropriming and heat shock treatment on sunflower (*Helianthus annuus* L.) chilling resistance and changes in soluble carbohydrates. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(5). <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2413-x>
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies Jr., F. T., & Geneve, R. L. (2010). *Plant Propagation Principles and Practices*. 8th (8th ed.; Pearson, Ed.). Retrieved from [https://www.scirp.org/\(S\(i43dyn45teexjx455qlt3d2q\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1819272](https://www.scirp.org/(S(i43dyn45teexjx455qlt3d2q))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1819272)
- Hugo Cota-Sánchez, J. (2018). Precocious Germination (Vivipary) in Tomato: A Link to

- Economic Loss? *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 88(4), 1443–1451. <https://doi.org/10.1007/s40011-017-0878-4>
- Hussain, A., Ahmed, I., Nazir, H., & Ullah, I. (2012). Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities. In *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. <https://doi.org/10.5772/50568>
- Ikeuchi, M., Iwase, A., Rymen, B., Lambolez, A., Kojima, M., Takebayashi, Y., ... Sugimoto, K. (2017). Wounding triggers callus formation via dynamic hormonal and transcriptional changes. *Plant Physiology*, 175(3), 1158–1174. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01035>
- Ikeuchi, M., Ogawa, Y., Iwase, A., & Sugimoto, K. (2016, May 1). Plant regeneration: Cellular origins and molecular mechanisms. *Development (Cambridge)*, Vol. 143, pp. 1442–1451. <https://doi.org/10.1242/dev.134668>
- Iliev, I., Gajdošová, A., Libiaková, G., & Jain, S. M. (2010). Plant Micropropagation. In *Plant Cell Culture: Essential Methods* (1st ed., Vol. 1, pp. 1–23). <https://doi.org/10.1002/9780470686522.ch1>
- Isah, T. (2020). Nodal segment explant type and preconditioning influence *in vitro* shoot morphogenesis in *Ginkgo biloba* L. *Plant Physiology Reports*, 25(1), 74–86. <https://doi.org/10.1007/s40502-019-00475-7>
- Jain, A., & Yadav, R. P. (2016). Influence of gelling agent on micropropagation cost and *in vitro* conservation of Turmeric (*Curcuma longa*) germplasm. *Journal of AgriSearch*, 3(4). <https://doi.org/10.21921/jas.v3i4.6703>
- Jaramillo, M., Álvarez, J., & Marín, M. (2012). *Características de los virus asociados a la virosis del tomate de árbol (Solanum betaceum) en Colombia** (Vol. 9).
- Kahia, J., Sallah, P. K., Diby, L., Kouame, C., Kirika, M., Niyitegeka, S., & Asimwe, T. (2015). A novel regeneration system for tamarillo (*Cyphomandra betacea*) via organogenesis from

- hypocotyl, leaf, and root explants. *HortScience*, 50(9), 1375–1378.
<https://doi.org/10.21273/hortsci.50.9.1375>
- Kolewe, M. E., Gaurav, V., & Roberts, S. C. (2008). Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. *Molecular Pharmaceutics*.
<https://doi.org/10.1021/mp7001494>
- Krishna Repalli, S., Kumar Geda, C., N Pradhan, N. S., & N Rao, G. J. (2019). Influence of Additional Nutrients and Gelling Agents on *in vitro* Response of Selected Indica Rice Varieties. *International Journal of Biology*, 11(4). <https://doi.org/10.5539/ijb.v11n4p26>
- Kunakhonnuruk, B., Inthima, P., & Kongbangkerd, A. (2019). *In vitro* propagation of rheophytic orchid, *epipactis flava* seidenf.- A comparison of semi-solid, continuous immersion and temporary immersion systems. *Biology*, 8(4), 72.
<https://doi.org/10.3390/biology8040072>
- Lavy, M., & Estelle, M. (2016). Mechanisms of auxin signaling. *Development (Cambridge)*, 143(18), 3226–3229. <https://doi.org/10.1242/dev.131870>
- Lazo-Javalera, M. F., Troncoso-Rojas, R., Tiznado-Hernández, M. E., Martínez-Tellez, M. A., Vargas-Arispuro, I., Islas-Osuna, M. A., & Rivera-Domínguez, M. (2016). Surface disinfection procedure and *in vitro* regeneration of grapevine (*Vitis vinifera* L.) axillary buds. *SpringerPlus*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2081-0>
- Lee, T. J., Zobayed, S., Firmani, F., & Park, E. J. (2019). A novel automated transplanting system for plant tissue culture. 181, 63–72.
<https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2019.02.012>
- Lee, W. K., Lim, Y. Y., Leow, A. T. C., Namasivayam, P., Ong Abdullah, J., & Ho, C. L. (2017). Biosynthesis of agar in red seaweeds: A review. *Carbohydrate Polymers*, 164, 23–

30. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.01.078>

Li, Z., Scott, K., Otter, D., Zhou, P., & Hemar, Y. (2018). Effect of temperature and pH on the properties of skim milk gels made from a tamarillo (*Cyphomandra betacea*) coagulant and rennet. *Journal of Dairy Science*, 101(6), 4869–4878. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-14050>

Li, Zhao, Scott, K., Hemar, Y., Zhang, H., & Otter, D. (2018). Purification and characterisation of a protease (tamarillin) from tamarillo fruit. *Food Chemistry*, 256, 228–234. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.091>

Lima, G. P. P., da Silva Campos, R. A., Willadino, L. G., Câmara, T. J., & Vianello, F. (2012). Polyamines, Gelling Agents in Tissue Culture, Micropropagation of Medicinal Plants and Bioreactors. In *Recent Advances in Plant in vitro Culture*. <https://doi.org/10.5772/51028>

Ling, W. T., Liew, F. C., Lim, W. Y., Subramaniam, S., & Chew, B. L. (2018). Shoot induction from axillary shoot tip explants of fig (*Ficus carica*) cv. japanese BTM 6. *Tropical Life Sciences Research*, 29(2), 165–174. <https://doi.org/10.21315/tlsr2018.29.2.11>

Loyola-Vargas, V. M., & Ochoa-Alejo, N. (2018). An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1815, pp. 3–13). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_1

Lutts, S., Benincasa, P., Wojtyła, L., Kubala, S., Pace, R., Lechowska, K., ... Garnczarska, M. (2016). Seed Priming: New Comprehensive Approaches for an Old Empirical Technique. In *New Challenges in Seed Biology - Basic and Translational Research Driving Seed Technology*. <https://doi.org/10.5772/64420>

Ma, Y. (2019). Seed coating with beneficial microorganisms for precision agriculture. *Biotechnology Advances*, 37(7), 107423.

<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107423>

- Martínez, E., Hío, J., Osorio, J., & Torres, M. (2009). Identification of *Colletotrichum* species causing anthracnose on Tahiti lime, tree tomato and mango. *Agronomia Colombiana*, 27(2), 211–218. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652009000200009
- Martins, C. C., da Silva, G. Z., Durigan, L. D., & Vieira, R. D. (2019). Pregerminative treatments of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) seeds. *Ciencia Florestal*, 29(1), 366–373. <https://doi.org/10.5902/1980509821217>
- Martins, J., Rodrigues, L., Santos, E., Batista, B., Gontijo, A., & Falqueto, A. (2018). Anatomy and photosystem II activity of *in vitro* grown *Aechmea blanchetiana* as affected by 1-naphthaleneacetic acid. *Biologia Plantarum*, 62(2), 211–221. <https://doi.org/10.1007/s10535-018-0781-8>
- Meneses, A. (2001). *EL SÍLICE, LA LUZ, LA CONCENTRACIÓN DE LOS REGULADORES DEL CRECIMIENTO Y DEL AGENTE GELIFICANTE EN LOS PROCESOS DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE ARROZ (Oryza sativa L.) var. CR-5272* (Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Biología). Retrieved from <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/54>
- Montero-Jiménez, M., Fernández, L., Alvarado, J., Criollo, M., Jadán, M., Chuquer, D., & Espinoza-Montero, P. (2019). Evaluation of the Cadmium Accumulation in Tamarillo Cells (*Solanum betaceum*) by Indirect Electrochemical Detection of Cysteine-Rich Peptides. *Molecules*, 24(12). <https://doi.org/10.3390/molecules24122196>
- Morton, J., & Dowling, C. (1987). Tree tomato. In J. Morton (Ed.), *Fruits of warm climates* (1st ed., Vol. 1, pp. 437–440). Retrieved from https://hort.purdue.edu/newcrop/morton/tree_tomato.html#Cropping and Yield

- Murillo-Gómez, P. A., Hoyos, R., & Chavarriaga, P. (2017). Organogénesis in-vitro usando tres tipos de tejidos de tomate de árbol [*Solanum betaceum* (Cav.)]. *Agronomía Colombiana*, 35(1), 5–11. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v35n1.61330>
- Noorhosseini, S. A., Jokar, N. K., & Damalas, C. A. (2018). Improving Seed Germination and Early Growth of Garden Cress (*Lepidium sativum*) and Basil (*Ocimum basilicum*) with Hydro-priming. *Journal of Plant Growth Regulation*, 37(1), 323–334. <https://doi.org/10.1007/s00344-017-9728-0>
- Obando, M., & Jordan, M. (2001). Regenerative responses of *Cyphomandra betacea* (Cav.) Sendt. (Tamarillo) cultivated *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 560, 429–432. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.560.83>
- Ogbuehi, H. C., Madukwe, D. K., & Ashilonu, P. (2013). ASSESSMENT OF HYDRO PRIMING OF SEEDS ON PERFORMANCE OF MORPHOLOGICAL INDICES OF BAMBARA GROUNDNUT (*Vigna subterrenea* LINN.) LANDRACE. *Global Journal of Biology, Agriculture and Health Sciences*, 2(2), 17–22.
- Olatunji, D., Geelen, D., & Verstraeten, I. (2017, December 1). Control of endogenous auxin levels in plant root development. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 18. <https://doi.org/10.3390/ijms18122587>
- Orqueda, M. E., Torres, S., Zampini, I. C., Cattaneo, F., Di Pardo, A. F., Valle, E. M., ... Isla, M. I. (2020). Integral use of Argentinean *Solanum betaceum* red fruits as functional food ingredient to prevent metabolic syndrome: effect of *in vitro* simulated gastroduodenal digestion. *Heliyon*, 6(2), e03387. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03387>
- Pantone. (2017). PANTONE Colour Chart. Retrieved June 11, 2020, from <https://www.pantone-colours.com/>

- Pérez, V. V. (2017). “IDENTIFICACIÓN DE MALEZAS HOSPEDERAS DE LOS VIRUS PVX, PVY, AMV Y TiCV, EN LAS ZONAS PRODUCTORAS DE TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum* Cav) DEL CANTÓN ANTONIO ANTE, PROVINCIA DE IMBABURA” (Universidad Técnica del Norte). Retrieved from [http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/6404/1/03 AGP 210 TRABAJO DE GRADO.pdf](http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/6404/1/03_AG_P_210_TRABAJO_DE_GRADO.pdf)
- Ponmurugan, P., & Kumar, S. (2012). *Applications of plant tissue culture* (1st ed., Vol. 1; NEW AGE INTERNATIONAL, Ed.). Retrieved from [https://bibliotecas.ups.edu.ec:2708/lib/upsal/reader.action?docID=3017440&ppg=1&query=plant tissue culture](https://bibliotecas.ups.edu.ec:2708/lib/upsal/reader.action?docID=3017440&ppg=1&query=plant+tissue+culture)
- Prohens, J., & Nuez, F. (2001). The tamarillo (*Cyphomandra betacea*): A review of a promising small fruit crop. *Small Fruits Review*, 1(2), 43–68. https://doi.org/10.1300/J301v01n02_06
- Puga, A. P. (2019). Desenvolvimento de biorreatores para a propagação de *Solanum betaceum* Cav. (Universidade d Coímbra). Retrieved from <http://hdl.handle.net/10316/87916>
- Rathore, M. S., Yadav, S., Yadav, P., Kheni, J., & Jha, B. (2015). Micropropagation of elite genotype of *Jatropha curcas* L. through enhanced axillary bud proliferation and *ex vitro* rooting. *Biomass and Bioenergy*, 83, 501–510. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.10.023>
- Revelo, J., Mora, E., Gallegos, P., & Garcés, S. (2008). *ENFERMEDADES, NEMATODOS E INSECTOS PLAGA DEL TOMATE DE ÁRBOL* (2nd ed.; INIAP, Ed.). Quito: INIAP.
- Sakina, S., Syaiful Anwar, & Kusmiyati, F. (2019). *In vitro* dendrobium orchid (*Dendrobium* sp.) plantlet growth in different concentration of BAP and NAA. *Jurnal Pertanian Tropik*, 6(3), 430–437. <https://doi.org/10.32734/jpt.v6i3.3192>

- Santa Cruz, S. B., Graciano-Ribeiro, D., Batista, J., Aquino, T., & Copati, L. A. (2006). Anatomia foliar de plantas micropropagadas de abacaxi. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 41(2), 185–194. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2006000200002>
- Sarker, U., & Oba, S. (2018). Augmentation of leaf color parameters, pigments, vitamins, phenolic acids, flavonoids and antioxidant activity in selected *Amaranthus tricolor* under salinity stress. *Scientific Reports*, 8(1), 12349. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30897-6>
- Shahzad, R., Khan, A. L., Bilal, S., Asaf, S., & Lee, I. J. (2018). What is there in seeds? Vertically transmitted endophytic resources for sustainable improvement in plant growth. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00024>
- Shankar, A., Gupta, R. K., & Singh, B. (2019). Establishing indicator leaf and its threshold values for need based nitrogen management using chlorophyll meter and leaf color chart in Bt cotton. *Journal of Plant Nutrition*, 42(2), 186–201. <https://doi.org/10.1080/01904167.2018.1551492>
- Siron, U., Noertjahyani, N., Taryana, Y., & Romiyadi, R. (2019). Pengaruh Konsentrasi Zat Pengatur Tumbuh Naphthalene Acetic Acid dan Benzil Amino Purin terhadap Pertumbuhan Protokorm Anggrek *Dendrobium spectabile* pada Kultur *In vitro*. *Paspalum: Jurnal Ilmiah Pertanian*, 7(1), 16. <https://doi.org/10.35138/paspalum.v7i1.107>
- Smith, R. H. (2013). Plant Tissue Culture. In A. Press (Ed.), *Plant Tissue Culture* (3rd ed.). <https://doi.org/10.1016/C2011-0-04367-3>
- Souza, A. V, & Pereira, ; (2007). Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. In *Rev. Bras. Pl. Med.*
- Suryani, R., & Sari, M. N. (2019). PENGGUNAAN BERBAGAI MACAM MEDIA TANAM

- DAN PEMBERIAN PUPUK ORGANIK CAIR PADA TAHAP AKLIMATISASI TERHADAP PERTUMBUHAN PLANLET ANGGREK BULAN (*Phalaenopsis amabilis*) HASIL KULTUR JARINGAN. *Journal of Applied Agricultural Science and Technology*, 3(1), 105–114. <https://doi.org/10.32530/jaast.v3i1.63>
- Teixeira, J. A., Winarto, B., Dobránszki, J., & Songjun, Z. (2015). Disinfection procedures for *in vitro* propagation of *Anthurium*. *Folia Horticulturae*, 27(1), 3–14. <https://doi.org/10.1515/fhort-2015-0009>
- Titan Biotech Ltd. (2015). Plant Tissue Culture Media preparation & Supplier | TM Media. Retrieved from <https://www.tmmedia.in/products/plant-tissue-culture-media>
- Trigiano, R. N., & Gray, D. J. (2016). *Plant Tissue Culture, Development, and Biotechnology* (1st Editio; R. N. Trigiano & D. J. Gray, Eds.). <https://doi.org/10.1201/9781439896143>
- Trimble, S. (2007). Encyclopedia of Water Science, Second Edition (Print Version). In *Encyclopedia of Water Science, Second Edition (Print Version)*. <https://doi.org/10.1201/noe0849396274>
- Trong, T. T., Truong, D. H., Nguyen, H. C., Tran, D. T., Nguyen Thi, H. T., Dang, G. Do, & Huu, H. N. (2017). Biomass accumulation of *Panax vietnamensis* in cell suspension cultures varies with addition of plant growth regulators and organic additives. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(9), 907–915. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.08.012>
- Tropicos.org. (2020). Name *Solanum betaceum* Cav. *Solanum Betaceum Name*, p. 1. Retrieved from <http://legacy.tropicos.org/Name/29608823>
- Villares, M., Sánchez, J., Viera, W., Soria, N., Sotomayor, A., Yanez, D., & Martínez, E. (2018). CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE FRUTOS DE TOMATE DE

- ÁRBOL (*Solanum betaceum* Cav.) DE UNA POBLACIÓN SEGREGANTE. *Revista de Investigación Talentos*, 5(1), 9–19. Retrieved from <http://190.15.128.230/index.php/talentos/article/view/24>
- Walley, L., & Knapp, S. (2011). Solanaceae Source: a taxonomic resource for the nightshade family. *Solanaceae Source*. Retrieved from <http://solanaceaesource.org/?spnumber=1301>
- Wang, S., & Zhu, F. (2020, January 1). Tamarillo (*Solanum betaceum*): Chemical composition, biological properties, and product innovation. *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 95, pp. 45–58. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.004>
- Weijers, D., Nemhauser, J., & Yang, Z. (2018). Auxin: small molecule, big impact. *Journal of Experimental Botany*, 69(2), 133–136. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx463>
- Welbaum, G. E. (1999). Cucurbit seed development and production. *HortTechnology*. <https://doi.org/10.21273/horttech.9.3.341>
- Wu, C. F., Karioti, A., Rohr, D., Bilia, A. R., & Efferth, T. (2016). Production of rosmarinic acid and salvianolic acid B from callus culture of *Salvia miltiorrhiza* with cytotoxicity towards acute lymphoblastic leukemia cells. *Food Chemistry*, 201, 292–297. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.054>
- Yan, J., Wang, B., Zhou, Y., & Hao, S. (2018). Resistance from agar medium impacts the helical growth of *Arabidopsis* primary roots. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.05.018>
- Zhang, R., Ren, Z., Sun, J., Tang, W., Ning, D., & Qian, Y. (2017). Method for monitoring the cotton plant vigor based on the WSN technology. *Computers and Electronics in Agriculture*, 133, 68–79. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2016.12.009>
- Zhao, Y., Sun, W., Wang, Y., Saxena, P. K., & Liu, C. Z. (2012). Improved mass multiplication

of *Rhodiola crenulata* shoots using temporary immersion bioreactor with forced ventilation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9542-x>

Zimmerman, R. H., Griesbach, R. J., Hammerschlag, F. A., & Lawson, R. H. (1986). *Tissue culture as a plant production system for horticultural crops: Conference on Tissue Culture as a Plant Production System for Horticultural Crops, Beltsville, MD, October 20-23, 1985*. Springer Netherlands.

Anexos

Anexo 1. Prueba de Kruskal-Wallis en fase de protocolos pregerminativos aplicados a semillas de *Solanum betaceum*.

TRATAMIENTO	DÍAS GERMINACIÓN		GERMINACIÓN (%)		Nº HOJAS		COLOR HOJAS		CONTAMINACIÓN BACTERIANA (%)	
	H	15,14	H	8,09	H	7,48	H	6,97	H	10,37
	p	0,0004	p	0,0135	p	0,0167	p	0,0188	p	<0,0001
	RANGOS		RANGOS		RANGOS		RANGOS		RANGOS	
PG1	68,23		40,87		40,69		41,65		69	
PG2	57,21		51,75		53,58		53,02		47	
PG3	37,21		64,63		63,5		63,69		47	
PG0	47,35		52,75		52,23		51,63		47	

Elaborado por: La autora, 2020

Anexo 2. Prueba de Kruskal-Wallis en fase de introducción al medio de cultivo de vitroplantas de *Solanum betaceum*.

TRATAMIENTO	RESPUESTA (%)		N° HOJAS		COLOR HOJAS		CALLOGÉNESIS (%)		CONTAMINACIÓN BACTERIANA (%)		CONTAMINACIÓN FÚNGICA (%)		FENOLIZACIÓN (%)	
	H	4,45	H	17,62	H	11	H	92,9	H	89,91	H	0,97	H	0,82
	p	0,0137	p	<0,0001	p	0	p	<0,0001	p	<0,0001	p	0,01	p	0,0037
	Rangos		Rangos		Rangos		Rangos		Rangos		Rangos		Rangos	
S	83,5		76,56		79,37		58,5		59,02		87,23		87,5	
Y	100,1		109,6		105,7		134,29		133,6		94,97		94,61	

Elaborado por: La autora, 2020

Anexo 3. Prueba de Kruskal-Wallis en fase de multiplicación de vitroplantas de *Solanum betaceum*.

FACTORES	TRATAMIENTOS	BROTACIÓN%		Nº HOJAS		COLOR HOJAS	
		H	0,05	H	10,86	H	15,02
		p	0,7378	p	0,0004	p	<0,0001
		Rango		Rango		Rango	
ESTADO FÍSICO MEDIO (M)	M1 SEMISÓLIDO	-		20,44		35,8	
	M2 BICÁPICO	-		34,56		19,2	

CONCENTRACIÓN ANA (C)		H	4,69	H	0,91	H	0,01
		p	0,0081	p	0,5952	p	0,9966
		Rango		Rango		Rango	
	C1 (0 ppm)	21		-		-	
	C2 (0,5 ppm)	30		-		-	
	C3 (1 ppm)	31,5		-		-	

INTERACCIÓN M x C		H	4,85	H	14,55	H	20,02
		p	0,076	p	0,0055	p	0,0003
		Rango		Rango		Rango	
	M1C1	-		31		29,83	
	M1C2	-		36,89		35,61	
	M1C3	-		35,78		41,94	
	M2C1	-		26,11		24,83	
	M2C2	-		21,72		19,28	
	M2C3	-		13,5		13,5	

Elaborado por: La autora, 2020